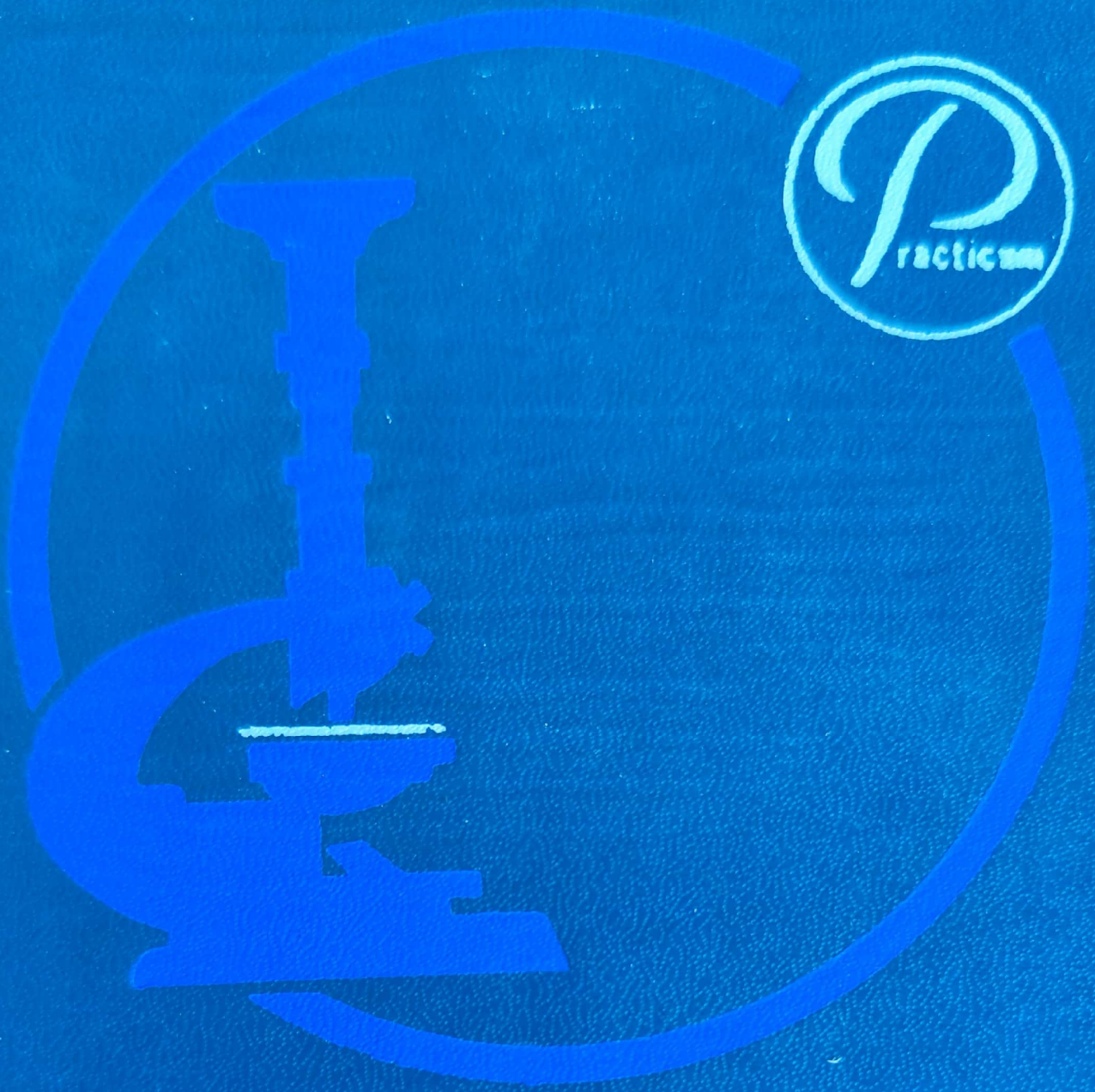


Practicum

E. MUREȘAN M. GABOREANU
A. T. BUCHAN • A. L. BABA

TEHNICI DE HISTOCHIMIE NORMALĂ ȘI PATOLOGICĂ

Scanned with OKEN Scanner

E. MUREȘAN • A. T. BOGDAN
M. GABOREANU • A. I. BABA

TEHNICI DE HISTOCHIMIE NORMALĂ ȘI PATOLOGICĂ

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL I

PRINCIPIILE GENERALE ALE TEHNICII HISTOCHIMICE

A. DEFINIȚIE. DOMENII DE APLICARE

HISTOCHIMIA are drept scop identificarea și localizarea în preparatele histologice a diferiților constituenți chimici ai celulelor și țesuturilor normale sau patologice.

Tehnicile histochimiei analitice presupun în majoritatea cazurilor o distrugere prealabilă a integrității celulelor sau țesuturilor în vederea obținerii unui omogenat în care apoi, prin procedee chimice sau fizico-chimice foarte exacte, atît sub aspect calitativ, cît și cantitativ, se identifică substanțele cercetate.

Prin analiza unui asemenea material se află mai ales valoarea medie a constituenților chimici și mai puțin apartenența lor la diferitele formațiuni structurale celulare sau tisulare.

Dimpotrivă, în tehnicile histochimice, alături de conservarea cît mai fidelă a compoziției chimice a celulelor și țesuturilor se urmărește întotdeauna și păstrarea cît mai nealterată a integrității lor structurale. Examinarea la microscop a unui preparat his-

Scanned with OKEN Scanner

tochimic este concomitent o analiză chimică și morfologică sau mai exact, o analiză „topochimică", deoarece se tinde la localizarea cît mai exactă, la scară celulară sau tisulară, a substanțelor cercetate.

Simpla „inventariere" a diferiților componenți chimici din celule sau țesuturi nu satisface deplin cerințele histochimiei moderne. Se cere în plus unei cercetări histochimice, ca prin modele experimentale adecvate, prin studierea fenomenelor biologice în întreagă dinamica lor etc. să încerce stabilirea unor corelații cît mai exacte între compoziția chimică a unor țesuturi sau celule oarecare și histofiziologia lor. Numai înțeleasă și aplicată astfel histochimia a reușit într-un răstimp de numai cîteva decenii să faciliteze apropierea mult sperată dintre morfologie, fiziologie și chimie.

Alături de acest mod de aplicare al tehnicilor histochimice se continuă și se dezvoltă tot mai mult aplicarea lor strict doar în vederea evidențierii unor aspecte morfologice (reacția Feulgen pentru studiul nucleilor, activitatea colinesterazei pentru evidențierea plăcilor motorii, activitatea adenozintrifosfatazei pentru studiul canaliculelor biliare ș.a.).

Și, în sfîrșit, dar nu la urmă, tehnicile histochimice au un loc bine consolidat în diagnosticul histopatologic.

Orientarea spre oricare din aceste direcții pretinde cercetătorului, pe de o parte, o cultură histologică vastă, iar pe de altă parte, cunoștințe de biochimie și fiziologie, precum și aplicarea corectă a diverselor tehnici histochimice. Astfel acceptată, histochimia va continua să rămînă histologie și nu o simplă aplicare a chimiei pe secțiuni histologice.

Scanned with OKEN Scanner

B. CONDIŢIILE EXACTITĂŢII METODELOR HISTOCHIMICE

Idealul ar fi ca în orice metodă histochimică să se poată realiza două deziderate majore: a) identificarea specifică şi constantă a substanţei chimice cercetate chiar dacă aceasta se află în cantităţi foarte mici; b) localizarea topografică precisă a substanţei cercetate, condiţie ce implică şi o conservare cît mai bună a integrităţii structurale celulare sau tisulare.

Toate momentele unei tehnici histochimice (recoltarea, fixarea, includerea etc.) pot influenţa în mod hotărîtor aceste două condiţii, dar ponderea cea mai mare revine fixării şi reacţiei histochimice propriu-zise, adică vizualizării substanţei cercetate.

1. FIXAREA HISTOCHIMICĂ

Fixarea histochimică impune exigenţe mult mai riguroase decît cea histologică, deoarece pe lîngă o fixare în înţelesul histologic al termenului, ea trebuie să nu deplaseze substanţele cercetate, să nu le dizolve, să nu le modifice constituţia chimică, să nu introducă în ţesuturi tocmai substanţele cercetate (de exemplu calciu, mercur, fosfaţi, glucide etc.) şi să permită desfăşurarea normală a reacţiilor chimice care urmează să fie aplicate.

Ca şi în tehnica histologică şi în histochimie se utilizează fixarea prin agenţi chimici şi fixarea prin agenţi fizici. Aceasta din urmă, împreună cu tehnica prelucrării ţesuturilor proaspete, nefixate, prezintă aici o utilizare mai largă.

ÎN FIXAREA CU AGENŢI CHIMICI, alegerea fixatorului adecvat este dictată, pe lîngă condiţiile enumerate

Scanned with OKEN Scanner

mai sus şi de starea sub care se află în ţesuturi substanţa cercetată. Întîlnim în acest sens trei situaţii diferite:

a) **A t u n c i c î n d** substanţa studiată este un compus insolubil, prezent în ţesuturi sub formă figurată, ca de exemplu grăsimile, sărurile minerale insolubile, melaninele ş.a., atitudinea optimă constă în alegerea unui bun fixator histologic sau chiar citologic, care deci să fixeze cît mai corect ţesuturile. Problema importantă în aceste cazuri nu este atît localizarea, imobilizarea substanţei cercetate (aceasta fiind figurată este deja imobilă), cît păstrarea ei neschimbată sub aspect calitativ şi cantitativ. Se vor elimina deci agenţii fixatori care o pot dizolva sau care ar constitui o incompatibilitate chimică.

b) **A l t e o r i,** substanţa cercetată deşi este solubilă în substanţele folosite la fixare, deshidratare sau includere, apare totuşi sub formă figurată, în preparatele fixate, datorită faptului că se afla încorporată într-un edificiu macromolecular. Din această categorie de substanţe fac parte proteinele, nucleo-, glico- şi mucoproteinele, enzimele ş.a. Cum complexele macromoleculare în care se află integrate aceste substanţe sînt în majoritatea cazurilor tot de natură proteică, rezultă că sînt indicate în aceste cazuri acele substanţe fixatoare care, prin crearea unor legături intermoleculare solide, consolidează întregul dispozitiv spaţial. Fixarea din punct de vedere topografic a acestor substanţe este asigurată, în majoritatea cazurilor, tot de către fixatorii histologici de calitate, cu condiţia ca aceştia să nu fie chimic incompatibili cu substanţa cercetată şi să nu perturbe reacţia de vizualizare a acesteia. Calitatea fixării nu va depinde exclusiv de natura substanţei cercetate, ci şi de natura chimică şi dispoziţia spaţială a com-

Scanned with OKEN Scanner

plexului macromolecular în care ea se află integrată. Astfel s-ar explica de ce unele substanţe din această categorie, ca de exemplu ADN, pot fi bine fixate topografic şi cantitativ, altele, ca de exemplu ARN, sînt imobilizate corect, dar sînt mai greu de conservat cantitativ, iar altele, ca glicogenul, sînt dificil de conservat, atît topografic cît şi cantitativ.

c) **A treia eventualitate,** cea mai nefavorabilă, este reprezentată de prezenţa în citoplasme a unor substanţe nefigurate, solubile şi nefăcînd parte din vreun edificiu macromolecular. Este deci vorba de substanţe cu greutate moleculară mică, difuzibile şi foarte mobile ca ionii de iod, clor, potasiu, uree ş.a. Majoritatea acestor substanţe pot fi fixate, fixarea lor fiind de fapt o precipitare cu ajutorul unor reactivi adecvaţi. Dar, aceşti reactivi au în general o greutate moleculară mare, sînt deci greu difuzibili, iar prin faptul că denaturează proteinele îşi reduc şi mai mult penetrabilitatea. Din aceste motive, fixatorii lichizi nu pot ajunge suficient de rapid în celule, astfel că, între timp, substanţele solubile cercetate pot prezenta deplasări mari, care fac preparatul inacceptabil sub aspect topochimic. Nici fixarea prin perfuzie vasculară, „in situ“ şi nici chiar tratarea cu reactivul precipitant a unor secţiuni, imediat ce acestea au fost obţinute din piese proaspete, congelate, nu a dat, în general, rezultatele scontate. Oricum, faţă de simpla imersie a pieselor în reactivul precipitant, procedeu cu cele mai slabe şanse de succes, procedeele amintite pot, în unele cazuri, să asigure o localizare la nivel tisular sau chiar celular (nu însă la nivel de organite celulare).

Chiar şi atunci cînd fixarea acestor substanţe este satisfăcătoare sub aspect topografic, pot surveni unele artefacte datorate unor particularităţi ale proce-

Scanned with OKEN Scanner

sului de precipitare. Astfel, deşi substanţa cercetată poate prezenta în ţesuturi o repartizare destul de uniformă, totuşi, precipitarea ei se face discontinuu, neuniform, sub forma unor inele periodice numite inelele lui Leisegang. Alteori apar în preparate zone de precipitare circumscrise, răspîndite întîmplător sau în relaţie cu structuri celulare preformate (suprafaţa membranei celulare, enclavele de grăsime, aparatul Golgi, membranele bazale etc.). În acest caz, primele particule precipitate şi respectiv structurile amintite, constituie nuclee de atracţie ce vor determina o precipitare locală mai intensă şi deci o falsă imagine topochimică.

Rezultă deci că alegerea unui fixator chimic este dictată de imperative multiple. Uneori, aşa cum s-a arătat, anumiţi fixatori histologici sau citologici satisfac condiţiile fixării histochimice. Alteori, conservarea cît mai bună a substanţelor cercetate ne poate obliga să fim mai puţin exigenţi în privinţa unei bune fixări a ţesuturilor. Şi, în sfîrşit, mai cu seamă în histochimia enzimelor, sîntem adesea nevoiţi să renunţăm la fixare. Pentru această din urmă situaţie, tehnica histochimică şi-a dezvoltat o serie de metode proprii, mai puţin utilizate în histologie şi anume: criotomia, criodeshidratarea şi criosubstituţia. În toate aceste metode se face uz de factori fizici de conervare şi în special de conservarea prin congelare.

ÎN FIXAREA CU AGENŢI FIZICI prin tehnicile amintite (criodeshidratare, criosubstituţie şi criotomie), factorul principal este congelarea cît mai rapidă a pieselor, la temperaturi foarte scăzute.

Descrierea detaliată a aparaturii necesare şi a modului de lucru va fi făcută în capitolul următor. Aici vom reţine doar aspectele legate de gradul de exacti-

Scanned with OKEN Scanner

tate al cercetării histochimice în cazul aplicării acestor tehnici. În acest sens ele prezintă avantaje incontestabile:

— congelare rapidă și la temperaturi foarte scăzute care oprește orice activitate enzimatică și prin aceasta împiedică autoliza post-mortem;

— cînd congelarea este corect condusă, conservarea structurilor din preparate echivalează cele mai bune fixări chimice pentru uz citologic;

— deplasarea substanțelor solubile sau difuzibile este mai redusă decît în oricare alt procedeu de fixare.

Prin aceste calități, tehnicile bazate pe criogenie au avut și continuă să aibă un aport important în dezvoltarea histochimiei.

Unele inconveniente trebuie totuși semnalate și anume:

— dificultăți în standardizarea metodelor și adaptarea lor la prelucrarea diferitelor țesuturi sau organe;

— posibilitatea apariției unor grave artefacte prin reticularea citoplasmelor atunci cînd congelarea nu decurge adecvat;

— producerea unor modificări chimice ale proteinelor.

La toate acestea trebuie adăugat că toate metodele amintite sînt costisitoare, căci necesită o aparatură complexă, greu de improvizat și reactivi speciali. O conduită rezonabilă ar fi să nu înlocuim automat orice fixare chimică cu procedeul de criodeshidratare sau criosubstituție, ci să rezervăm aceste tehnici doar pentru cazurile în care fixarea chimică nu este compatibilă cu tehnica histochimică ce ur-

Scanned with OKEN Scanner

meazâ să fie aplicată. Cît despre criotomie, aceasta rămîne metoda de elecţie pentru evidenţierea majorităţii activităţilor enzimatice.

2. REACŢIILE PENTRU VIZUALIZAREA SUBSTANŢELOR CERCETATE

Implică şi ele o serie de factori ce pot influenţa gradul de exactitate al metodelor histochimice (localizări eronate, pierderi din substanţa cercetată etc.).

Numai în puţine cazuri fixarea este suficientă pentru demonstrarea unor substanţe, vizualizarea lor fiind posibilă datorită propriei lor culori sau altor proprietăţi fizice. În marea majoritate a cazurilor ele trebuie relevate, vizualizate, prin diferite reacţii histochimice. Scopul fiecărei reacţii histochimice este acela de a furniza în final, la examenul microscopic al preparatului, un semnal care să ne informeze, cît mai corect cu putinţă, asupra prezenţei unei sau unui grup de substanţe. Purtătorul material al acestei informaţii este, în general, produsul colorat al unei reacţii chimice dintre substanţa cercetată şi reactivii chimici adecvaţi pentru determinarea ei.

L. Lison numeşte **cromofor** gruparea responsabilă de caracterul colorat al produsului reacţiei histochimice (sau gruparea ce determină fluorescenţa, absorbţia razelor UV, a razelor X etc.).

Se va analiza în continuare: a) modul formării şi valoarea localizatoare a cromoforilor; b) desfăşurarea; c) specificitatea şi d) sensibilitatea reacţiilor histochimice, totul în corelaţie cu problema condiţiilor exactităţii acestor reacţii.

MODUL DE FORMARE ŞI VALOAREA LOCALIZATOARE A CROMOFORULUI ne oferă trei situaţii distincte:

a) **Există cazuri** în care cromoforul fiind o proprietate inerentă a substanţei cercetate este de-

Scanned with OKEN Scanner

celabil fără altă manevră accesorie decît fixarea (de exemplu, granulele de melanină datorită culorii lor naturale, acizii nucleici prin spectrografia de absorbție în raze UV, metalele grele prin microradiografie cu raze X, serotonina prin fluorescență). Valoarea localizatoare a cromoforului este maximă, cu condiția unei bune fixări.

b) **În alte cazuri,** mult mai numeroase, substanța cercetată nu devine decelabilă decît în urma unei reacții chimice la care ea participă efectiv și în cursul căreia radicalul cromofor format este introdus artificial chiar în molecula substanței cercetate. Așa este cazul evidențierii ADN prin reacția Feulgen, a fierului prin reacția Perls, a glicogenului prin reacția PAS etc. Valoarea localizării topochimice este bună, căci locul producerii reacției de culoare corespunde cu localizarea substanței cercetate. Exactitatea metodei poate fi afectată mai ales în timpul fixării sau al celorlate momente preparatoare (prin difuzie sau solubilizare), decît în cursul reacției propriu-zise.

c) **În alte cazuri,** substanța cercetată declanșează o reacție la care ea nu participă în mod direct și al cărui rezultat este formarea cromoforului în reactivul de demonstrare, cromofor ce nu este introdus în molecula substanței cercetate. Moleculele de cromofor se formează în reactivul de demonstrare, în zonele unde acesta va veni în contact cu structurile ce conțin substanța cercetată. În aceste zone se va realiza suprasaturație locală a cromoforului și în consecință, o vizualizare a sa prin precipitare. Localizarea topochimică a reacției este consecința prezenței unor grupări în molecula substanței cercetate, care-i conferă acesteia o afinitate mai mare

Scanned with OKEN Scanner

sau mai mică, față de precipitatul format. Exemple de asemenea reacții sînt: metodele pentru decelarea grupărilor reducătoare cu ajutorul fericianurei ferice, majoritatea metodelor bazate pe reducerea unei sări de argint și totalitatea metodelor pentru evidențierea activităților enzimatice.

Chiar în cazul unei fixări histochimice impecabile, cromoforul, care nu este integrat în molecula substanței cercetate, poate prezenta deplasări atît de mari, încît preparatele să fie lipsite de orice informație topochimică. Astfel, în cazul în care viteza de formare a cromoforului este mică, moleculele sale pot fi antrenate de la locul lor de formare și să precipite la distanță, pe structuri care nu conțin substanța cercetată, dar care reține totuși precipitatul prin mecanisme fără raport cu reacția chimică utilizată (încărcarea electrică, suprafață rugoasă, liposolubilitate etc.). Se produc astfel **reacții fals-pozitive**. În felul acesta s-a explicat „prezența" fosfatazei alcaline în nucleii celulelor.

Alteori, cromoforul fie că nu se formează în cantitate suficientă pentru a putea precipita (substanța cercetată are o concentrație redusă), fie că precipitatul format rămîne în reactiv (substanța cercetată nu are suficiente grupări reactive care să-l rețină), astfel că rezultă **reacții fals-negative.**

Este evident că acest tip de reacție impune cele mai multe precauții în interpretarea rezultatelor. O primă recomandare este aceea de a efectua reacțiile cu secțiunile lipite pe lamele și introduse astfel în microcuve cu șanțuri (fig. 1) unde, dat fiind volumul mic de reactiv, cromoforul va atinge mai repede suprasaturația locală necesară producerii precipitatului. Acest lucru este important, mai cu seamă în cazurile în care substanțele pe care le evidențiem

Scanned with OKEN Scanner

se află în țesuturi în cantități foarte mici. Valoarea topochimică a acestor reacții trebuie verificată făcînd concomitent două sau mai multe reacții diferite, dar echivalente și urmărind apoi gradul de concordanță al rezultatelor. Un motiv de dubiu îl constiuie doar constatarea unor localizări diferite ale precipitatului colorat, nu și faptul că în unele reacții precipitarea se face mai aglomerat, deci cu o imagine mult mai contrastantă, iar în altele se face mai fin și difuz. În acest din urmă caz, claritatea imaginii de absorbție este decisă în mare măsură și de calitățile mediului de montare. Se cere ca indicele de refracție al acestuia să fie cît mai apropiat ca valoare de cel al produsului de reacție.

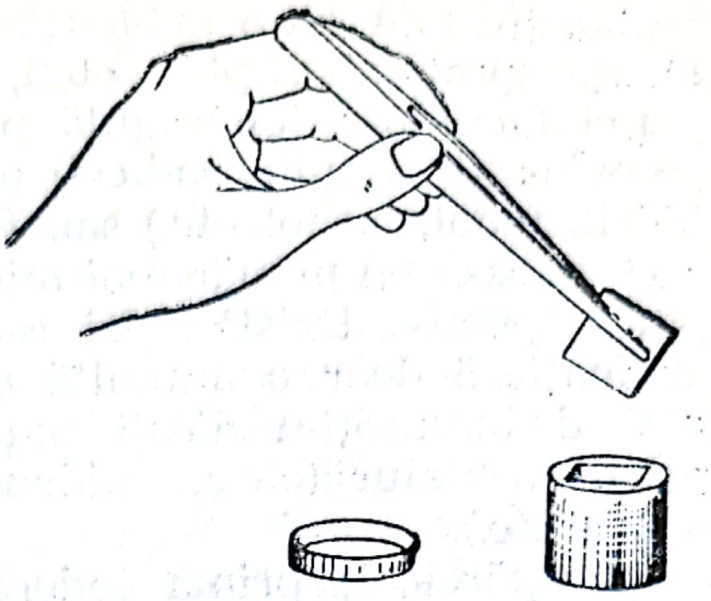


Fig. 1 — Microcuve cu șanțuri pentru reacții pe secțiuni lipite pe lamele (după M. Arnold, 1968)

C. SPECIFICITATEA ȘI SENSIBILITATEA REACȚIILOR HISTOCHIMICE

Din numărul mare de reacții histochimice intrate în uz pînă în prezent sînt relativ puține acelea care pot fi echivalente în privința specificității cu reacțiile de microchimie analitică. În marea lor majoritate, reacțiile histochimice nu evidențiază entități chimice definite, ci doar grupe de substanțe și mai ales radicali sau funcții chimice.

Scanned with OKEN Scanner

Reacţiile de grup evidenţiază grupe mari de substanţe (proteine, lipide etc.), aprofundarea investigaţiei făcîndu-se de regulă prin procedee care pun în evidenţă anumiţi radicali (carbonil, carboxil, sulfhidril, fenol, naftol etc.) sau funcţii chimice care caracterizează un număr mai mic de substanţe din grupul respectiv. Există apoi reacţii histochimice care evidenţiază doar o anumită proprietate chimică legată de anumiţi radicali sau funcţii chimice (proprietatea reducătoare, oxidantă, bazofilia, metacromazia etc.).

S-ar părea, la prima vedere, că majoritatea reacţiilor histochimice au o specificitate destul de redusă, deoarece există radicali sau proprietăţi chimice comune pentru substanţe foarte diferite sub aspectul naturii şi funcţiei lor biologice. Această situaţie impune, în numeroase cazuri, o analiză complementară a rezultatelor, cu scopul de a delimita în cadrul a ceea ce L. Lison numeşte specificitate teoretică (totalitatea substanţelor evidenţiabile prin reacţia respectivă), specificitatea actuală sau efectivă. Aceasta din urmă este raportată numai la o parte din substanţele evidenţiabile şi anume, la acelea care se pot afla în ţesutul sau organul cercetat într-o concentraţie suficient de mare pentru ca reacţia să le poată vizualiza. Coroborînd deci rezultatele reacţiilor histochimice cu datele cunoscute de analiză microchimică ale diferitelor celule, ţesuturi sau organe, se va putea constata adesea că specificitatea actuală a reacţiei este legată de un număr mult mai mic de substanţe (sau chiar de una singură), în comparaţie cu cel sugerat de specificitatea teoretică. Uneori este posibil să apreciem prezenţa şi localizarea unei substanţe prin efectuarea reacţiei histochimice adecvate, pe un preparat de control, după prealabila îndepăr-

Scanned with OKEN Scanner

tare sau blocare a substanței respective (de exemplu, efectuarea reacției PAS după tratarea secțiunii cu diastază ne permite să concludem că în zonele cu reacție absentă sau atenuată s-a aflat glicogen).

Specificitatea majorității reacțiilor histochimice este determinată nu numai de reacția propriu-zisă, ci și de tratamentul prealabil al probelor (fixare, includere etc.). Este deci absolut necesar să se respecte cu stricteţe toate prescripțiile metodelor, căci modificări aparent neînsemnate pot schimba în mod radical semnificația rezultatelor. Așa, de exemplu, cu reactivul Schiff, în funcție de tratarea prealabilă a probelor, se pot evidenția substanțe foarte diferite: glucide, lipide, proteine, acizi nucleici etc. În aplicarea reacțiilor histochimice nu mai avem acea „toleranță" uneori destul de largă, din tehnicile de colorare histologică. Se impune deci o standardizare riguroasă a condițiilor de lucru, utilizarea de reactivi chimic puri, respectarea întocmai a compoziției reactivilor, a duratei lor de acțiune, a temperaturii, a PH-ului ș.a. Nu se va omite nici faptul că numeroase reacții nu-și conservă intensitatea de culoare inițială decît un timp limitat, fapt ce impune examinarea sau fotografierea lor fără întîrziere. Atunci cînd este posibil se va prefera prelucrarea simultană a probelor provenite de la diferite loturi experimentale. Cînd modelul experimental impune repetarea eșalonată în timp a reacțiilor, se va ține seama că rezultatele sînt comparabile doar dacă s-a lucrat, chiar din momentul prelevării probelor, în condiții absolut identice.

Demonstrarea „in vitro" a specificității și sensibilității unei reacții de biochimie analitică, nu este un argument suficient pentru a recomanda aplicarea ei ca atare și în histochimie. Aceasta, în primul

Scanned with OKEN Scanner

rînd pentru faptul că în timp ce metodele biochimiei analitice se aplică la substanţele în prealabil izolate şi purificate, metodele histochimice se aplică pe secţiuni de ţesuturi sau organe. În structura acestora coexistă foarte numeroşi componenţi chimici ce se pot influenţa reciproc sau pot fi modificaţi chiar de către reactivii utilizaţi, atît în privinţa proprietăţilor lor chimice sau fizico-chimice, cît şi în privinţa localizării lor reale. Cu toată specificitatea şi sensibilitatea ridicată a unor reacţii histochimice pentru substanţe ca glucoza, ureea, clorurile, sulfaţii, fosfaţii solubili ş.a., totuşi evidenţierea lor corectă sub aspect histochimic şi mai ales topochimic este încă greu de realizat. Aceasta, în primul rînd din cauză că este vorba de substanţe cu greutate moleculară mică, solubile, foarte difuzibile şi deci greu de imobilizat în locurile unde se aflau „in vivo". În al doilea rînd, pentru că vizualizarea acestor substanţe presupune precipitarea lor sub formă cît mai puţin solubilă, proces care, aşa cum s-a mai arătat, poate fi el însuşi sursă de eroare, căci este posibil ca nucleele de precipitare să se formeze şi în zone unde în mod normal substanţa cercetată lipseşte, fie că precipitarea se face atît de fin şi de difuz încît mai poate fi observată la microscop. În aceste cazuri deci, valoarea topochimică a reacţiilor are limite determinate de anumiţi factori fizico-chimici greu de controlat.

Situaţia este mult mai favorabilă în cazul reacţiilor pentru substanţele organice macromoleculare, deoarece acestea pot fi mai uşor conservate şi imobilizate prin denaturare sau precipitare. În urma acestui tratament este însă greu, mai ales în cazul enzimelor, să apreciem intensitatea activităţii spe-

Scanned with OKEN Scanner

cifice, căci a fost afectată în măsură mai mare sau mai mică structura lor secundară și terțiară. Nu trebuie uitat nici faptul că, printr-un pretratament neadecvat, numeroase proteine, polizaharide, acizi nucleici ș.a. pot fi îndepărtate din secțiune prin hidroliză și astfel, intensitatea reacției va fi diminuată. Intensitatea unei reacții histochimice este deci o noțiune relativă și rezultatele sînt comparabile doar atunci cînd prelucrarea probelor s-a făcut în condiții perfect standardizate.

În lucrările curente de histochimie, aprecierea rezultatelor se face de regulă numai sub aspect calitativ: substanța cercetată este prezentă sau absentă la nivelul anumitor structuri. Se completează totuși aceste observații și cu indicații de ordin cantitativ, precizînd faptul că substanța respectivă se află în cantitate foarte redusă (∓), moderată (+), mare (++) sau foarte mare (+++). Aceleași observații le facem și în aprecierea intensității activităților enzimatice. În majoritatea cazurilor, aceste aprecieri sînt legate de cantitatea de precipitat colorat rezultat în urma utilizării anumitor reactivi. Tocmai din această cauză, o apreciere cantitativă mai exactă ar fi hazardată, căci nu există întotdeauna o proporționalitate strictă între cantitatea de precipitat format și cantitatea substanței cercetate. S-a arătat mai înainte că sînt posibile pierderi, fie în decursul fixării (dizolvare, hidroliză), fie chiar în decursul reacției, prin faptul că nu întotdeauna precipitatul format este absolut insolubil. Mai intervine apoi și modul în care se constituie precipitatul, în sensul că o substanță care formează agregate mari ne va da impresia unei reacții mai intense decît dacă aceeași cantitate de precipitat se află dispersată sub formă de particule foarte fine.

10202

Scanned with OKEN Scanner

În mod teoretic, toate impreciziile ce ţin de factori subiectivi ar trebui să fie eliminaţi prin recurgerea la metodele fotometrice. În realitate, numărul reacţiilor histochimice care se pretează cu adevărat la asemenea măsurători este încă restrîns. Chiar şi în aceste cazuri, metoda permite obţinerea unor valori obiective, numai dacă este aplicată de o persoană suficient de experimentată în acest domeniu şi care deci cunoaşte toate sursele de eroare posibile. Pentru lucrările curente, avantajele citofotometriei nu sînt evidente, mai ales dacă avem în vedere preţul foarte ridicat al aparatului şi faptul că testarea corectă a unui preparat necesită o durată de timp destul de mare.

În cazul estimării subiective a rezultatului unei reacţii şi mai ales atunci cînd diferenţele de intensitate ale reacţiei din diferitele preparate sînt reduse, sîntem deseori influenţaţi de natura experimentului şi deci înclinăm să acordăm rezultatul la ceea ce credem că ar trebui să fie. În aceste cazuri este bine să solicităm opinia unui observator neutru.

Cît priveşte sensibilitatea teoretică maximă a majorităţii reacţiilor histochimice, aceasta s-a dovedit a fi chiar mai ridicată decît a procedeelor de microchimie analitică. Astfel, de exemplu, se pot detecta cantităţi de $2{,}5 \cdot 10^{-7}$ gamma de fier, 10^{-5} gamma de ADN, $5 \cdot 10^{-5}$ gamma de proteine etc. Cu toate acestea, din cauză că reacţiile histochimice se apreciază la microscop, sensibilitatea lor teoretică este limitată de însăşi puterea de separaţie a microscopului. Este deci posibil să decelăm prezenţa unei cantităţi de $2{,}5 \cdot 10^{-7}$ gamma de fier, doar dacă aceasta este agregată în celulă într-o singură granulă, suficient de mare pentru ca să se poată observa la micros-

Scanned with OKEN Scanner

cop. Dimpotrivă, dacă aceeaşi cantitate de fier este dispersată în citoplasmă sub formă de granule cu diametrul sub 0,3 microni, reacţia ne poate apărea negativă.

Toate aceste consideraţii referitoare la limitele şi posibilităţile histochimiei, nu au fost prezentate pentru a sugera o atitudine pesimistă ci, dimpotrivă, pentru a sublinia importanţa ce trebuie acordată acurateţei în efectuarea tuturor timpilor preparatului histochimic, în reacţiile de control şi la interpretarea rezultatelor. Nu trebuie să uităm că histochimia are, faţă de biochimia analitică, avantajul de a putea examina în mod sintetic diferiţii constituenţi chimici ai materiei vii, celulare şi necelulare, cu păstrarea cît mai fidelă a localizării lor reale. Pentru aceasta, într-o perioadă de timp relativ scurtă, histochimia s-a dezvoltat într-un mod extraordinar, metodele ei s-au diversificat şi ameliorat în mod considerabil şi există toate motivele să credem că această evoluţie ascendentă va continua şi în viitor.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL II

PRETRATAMENTUL PROBELOR PENTRU REACȚII HISTOCHIMICE

Prin pretratament designăm o succesiune de operații prin care probele recoltate sînt duse pînă în faza de secțiuni adecvate pentru a fi supuse diferitelor reacții histochimice. Reacția propriu-zisă nu este decît actul final al oricărei tehnici histochimice, căci prin ea evidențiem substanțele conservate și pregătite pentru reacție prin pretratament. Orice greșeală făcută pe parcursul pretratamentului rămîne iremediabilă, chiar dacă reacția histochimică propriu-zisă este efectuată în mod impecabil. De aceea este absolut necesar să se cunoască modul de acțiune al tuturor factorilor, care în faza de pretratament a probelor pot să influențeze conservarea calitativă, cantitativă și topografică a substanțelor cercetate.

A. RECOLTAREA

Recoltarea probelor în cazul lucrărilor experimentale trebuie făcută cu maximum de rapiditate, deoarece modificările biochimice „post-mortem" sînt foarte precoce și preced cu mult pe cele structurale.

Scanned with OKEN Scanner

Prin aceasta, gama reacţiilor aplicabile unui material necropsic este considerabil redusă. În compensaţie, formolul, fixatorul uzual în serviciile de morfopatologie, permite efectuarea în bune condiţii a numeroase şi variate reacţii histochimice.

Dimensiunile probelor vor fi mai mici decît pentru examinările histologice şi, în general, nu se va depăşi grosimea de 3 mm. Pentru unele tehnici speciale (congelare-deshidratare, congelare-substituţie ş.a.) este necesar să secţionăm cu briciul probe subţiri de 1 mm sau chiar mai puţin. Astfel, în multe cazuri, este destul de greu să obţinem imagini mai extinse din arhitectura unui organ.

În cadrul cercetărilor experimentale se va avea grijă ca sacrificarea animalelor în vederea recoltării să se facă în condiţii identice, deoarece tabloul histochimic a numeroase organe poate să fie substanţial modificat de factori ca: bioritm, temperatură, anotimp, alimentaţie etc.

B. FIXAREA CU AGENŢI CHIMICI

Fixarea histochimică trebuie să fie întotdeauna cît mai adecvată reacţiilor ce urmează să fie efectuate. Aceasta înseamnă, pe de o parte, păstrarea cît mai neschimbată cu putinţă a structurii celulelor şi ţesuturilor, iar pe de altă parte, conservarea integrităţii chimice şi a localizării diferitelor substanţe ce fac obiectul cercetării. Deseori, aceste două deziderate se exclud reciproc, aşa încît sîntem nevoiţi să ne mulţumim cu o conservare mediocră a structurilor sau chiar să renunţăm total la fixarea chimică.

Scanned with OKEN Scanner

Nu există un agent fixator chimic potrivit pentru conservarea tuturor substanţelor evidenţiabile prin reacţii histochimice. Un fixator dat poate conserva, într-o măsură mai mare sau mai mică, anumite substanţe (prin denaturare, coagulare etc.), dar concomitent poate îndepărta alte substanţe, parţial sau total, prin solubilizare. Este deci foarte important pentru practica fixării histochimice să se cunoască cît mai exact efectul agenţilor chimici uzuali asupra grupelor reactive ale diferiţilor componenţi chimici tisulari.

a) Formolul. Cu toate că în fixarea histologică şi citologică, formolul nu este considerat ca fixator ideal, în histochimie el ocupă un loc de prim rang, în special datorită reacţiilor sale complexe cu proteinele. Se admite că sub acţiunea formolului se formează punţi de legătură metilenice între macromoleculele proteice alăturate. Grupele cele mai reactive sînt cele aminice, iminice, amidice, peptidice, guanidil, hidroxil, carboxil, sulfhidril şi inelele aromatice. Combinaţiile formate sînt reversibile prin simpla spălare cu apă, aşa încît majoritatea grupărilor reactive rămîn ulterior libere să reacţioneze cu diferiţii reactivi utilizaţi. În schimb, reacţia formolului cu hidrogenul aromatic din triptofan, tirozină, fenilalanină şi histidină este ireversibilă.

Unele neajunsuri ale fixării cu formol pot fi în mare parte remediate prin prepararea de soluţii izotone şi mai ales tamponate la un anumit pH. Sub această formă, soluţiile de formol sînt eficace chiar şi în numeroase reacţii de histoenzimologie, precum şi în procedeele de identificare a unor substanţe organice prin extracţie enzimatică. Prezentăm în continuare cele mai uzuale soluţii fixatoare pe bază de formol:

Scanned with OKEN Scanner

Formol neutru: formol conc. 10 ml; apă dist. 90 ml; carbonat de calciu în exces (aprox. 1 g). Durata fixării pentru probe de aproximativ 5 mm: 24—48 ore.

Formol salin: formol conc. 10 ml; clorură de sodiu 0,9 g; apă dist. 90 ml. Durata fixării: 24—48 ore.

Formol tamponat (Lillie): formol conc. 10 ml; apă dist. 90 ml; fosfat monosodic 0,4 g; fosfat disodic anhidru 0,65 g. Durata fixării: 24—72 ore.

Formol-calciu (Baker): formol conc. 15 ml; sol. 1,3% clorură de calciu anhidră 85 ml. Durata fixării: 16—24 ore.

Formol tamponat-sucroză (Holt-Hicks): formol conc. 10 ml; sucroză 7,5 g; tampon fosfat M/15 pH 7,4 ad. 100 ml. Durata fixării: 24—48 ore.

Formol bromurat (Konn-Darow): formol conc. 10 ml; bromură de amoniu 2 g; apă dist. 85 ml. Durata fixării: 24—48 ore.

Formolul lui Williams-Jakson: formol calciu (Baker) 100 ml; clorură de cetilpyridină 0,5 g. Durata fixării: 24—48 ore.

Formolul lui Pearson: formol conc. 10 ml; sucroză 15 g; amoniac (0,880) 1 ml; apă dist. ad 100 ml. Amestecul trebuie să aibă pH-ul 7,6. Durata fixării: 18—24 ore.

b) Glutaraldehida (dialdehida glutarică $(CH_2)_3CHO \cdot CHO$) este un agent fixator cu acţiune rapidă, utilizat cu bune rezultate în conservarea structurii şi activităţii unor enzime, a noradrenalinei etc. Realizează un număr mai mare de punţi între lanţurile proteice decît formolul, iar acestea sînt mult mai

Scanned with OKEN Scanner

rezistente la hidroliza acidă. Se recomandă următoarele amestecuri:

Amestecul Sabatini-Bensch-Barrnett: glutaraldehidă sol. 25% 25 ml; tampon fosfat (sau cacodilat) 0,1 M la pH 7,2, 25 ml. Concentrația finală de glutaraldehidă este de 1,5%. Durata fixării: 1—6 ore.

Amestecul Millonig: 7 ml sol. 0,2 M fosfat monosodic; 43 ml sol. 0,2 M fosfat disodic; 50 ml sol. 5,7% zaharoză. Cu acest tampon se aduce soluția comercială de glutaraldehidă la concentrația finală de 6,5%. Durata fixării: 1—6 ore.

Amestecul de glutaraldehidă-dextran-glucoză: se dizolvă 3 g dextran și 3 g glucoză în 100 ml tampon cacodilat 0,1 M și pH 7,4; cu acest amestec se aduce soluția comercială de glutaraldehidă la concentrația finală de 3%. Durata fixării: 1—6 ore.

c) Sărurile metalelor grele. Mecanismul lor de acțiune nu este încă suficient elucidat, așa încît, amestecurile pe bază de săruri de metale grele nu sînt fixatori de rutină în histochimie. Totuși, pentru unele tehnici speciale (evidențierea lipidelor, lipoproteinelor, mucopolizaharidelor, reacția cromafină etc.) utilizarea lor este indispensabilă.

1. **Sărurile de crom** formează cu apa combinații de tipul Cr-O-Cr care la rîndul lor se combină cu grupări reactive din moleculele proteice, în special cu grupările carboxil și hidroxil. Deoarece nu s-a determinat măsura exactă a acțiunii cromului și asupra altor grupe reactive se evită utilizarea sărurilor de crom în fixarea proteinelor. Se utilizează următoarele amestecuri în histochimia catecolaminelor, lipoproteinelor și lipidelor:

Scanned with OKEN Scanner

Amestecul Hillarp-Hökfelt: sol. apoasă 5% bicromat de potasiu 100 ml; sol. apoasă 5% cromat de potasiu 10 ml; pH-ul sol. este de 5,6. Se utilizează pentru evidențierea adrenalinei și noradrenalinei, durata tratamentului fiind de 16—24 ore.

Amestecul Eltfman pentru „cromarea" controlată a lipidelor: bicromat de potasiu 2,5 g; tampon acetat 0,2 M cu pH 3,5 ad 100 ml. Tratamentul probelor se face la 56°C timp de 18 ore.

Amestecul Eltfman pentru fosfolipide: bicromat de potasiu 2,5 g; sol. 5% clorură mercurică 100 ml. Durata fixării: 72 ore la temperatura laboratorului.

2. **Sărurile mercurice.** Clorura mercurică sau sublimatul este un excelent agent fixator pentru examenul histologic, dar în histochimie este evitat, deoarece nu se cunoaște în ce măsură legăturile sale cu grupările reactive din proteine (în special grupările sulfhidril, carboxil, hidroxil și acidul fosforic din nucleoproteine) sînt reversibile după spălarea cu apă și eliminarea precipitatelor mercurice cu iod și tiosulfat. Nu se vor folosi deci amestecuri pe bază de sublimat în reacțiile pentru nucleoproteine și grupări sulfhidril. Se pot efectua însă reacții generale pentru proteine (ca reacția cu tetrazoniu, Millon și Sakaguchi). Prezentăm două amestecuri preconizate de Lillie:

Amestecul a — clorură mercurică 6 g; acid acetic glacial 5 ml; formol concentrat 10 ml; apă dist. 85 ml. Durata fixării: 12—24 ore.

Amestecul b — clorură mercurică 6 g; acetat de sodiu 1,25 g; apă dist. 90 ml; în momentul folosirii se adaugă formol conc. Durata fixării: 12—24 ore.

3. **Sărurile de plumb** sînt utilizate exclusiv în histochimia mucopolizaharidelor acide.

Scanned with OKEN Scanner

a. **Amestecul Lillie:** azotat de plumb 8 g; formol conc. 10 ml; apă dist. 10 ml; alcool etilic absolut 80 ml. Durata fixării: 24 ore la temperatura laboratorului; 48—72 ore la 0—5°C; 10—14 zile la —25°C.

b. **Amestecul Mota-Ferri-Yoneda:** subacetat de plumb 1 g; alcool etilic absolut 50 ml; apă dist. 50 ml; acid acetic 0,5 ml. Durata fixării: 24 ore. Dacă se formează în țesuturi cristale de acetat de plumb, acestea pot fi îndepărtate prin tratarea secțiunilor cîteva minute cu HCl sol. 0,1 N.

d) Osmiul. Cu toate calitățile sale de excelent fixator citologic, în microscopia optică și electronică, tetraoxidul de osmiu, numit uneori și acid osmic, este utilizat în histochimie mai ales pentru evidențierea lipidelor nesaturate prin așa-numita înnegrire osmică. Se consideră că în urma oxidării dublelor legături din lipidele nesaturate, tetraoxidul de amoniu este redus sub formă de bioxid de osmiu, de culoare neagră. Fiind un oxidant puternic, soluțiile de tetraoxid de osmiu trebuie preparate cu toate precauțiile prescrise de tehnica histologică. Probele vor fi foarte subțiri, căci penetrarea este lentă (0,5 mm în 12 ore).

Fixatorul Palade: sol. 2% tetraoxid de osmiu 25 ml; sol. HCl 0,1 N 11 ml; sol. NaCl 8,5% 3,6 ml și 10 ml tampon barbital-acetat 0,1 M cu pH 7,2. Durata fixării: 12—24 ore la +4°C pentru probe de 2 mm grosime.

Alcool și acetonă. Fixarea la rece cu alcool etilic absolut sau cu acetonă anhidră este încă utilizată în evidențierea unor activități enzimatice, deși formaldehida și glutaraldehida s-au dovedit a fi superioare. Alcoolul etilic, metilic și izopropilic, simplu sau în diferite amestecuri, este utilizat în fixarea glicogenului, mucopolizaharidelor, acizilor

Scanned with OKEN Scanner

nucleici ş.a. Prezentăm în continuare cîteva asemenea amestecuri:

1. **Amestecul Carnoy:** alcool etilic absolut 60 ml; cloroform 30 ml; acid acetic glacial 10 ml. Durata fixării: probe de aproximativ 5 mm 1—2 ore la temperatura laboratorului sau 18 ore la 0°C. Este fixatorul de elecţie pentru acizii nucleici, precum şi pentru metodele de identificare a unor substanţe prin extracţie enzimatică specifică.

2. **Amestecul Geandre:** sol. saturată de acid picric în alcool etilic 96° (aprox. 9 g%) 85 ml; formol conc. 10 ml; acid acetic glacial 5 ml. Durata fixării: pentru glicogen 18 ore la —73°C (amestec refrigerent de acetonă şi CO_2 solid).

3. **Amestecul Lillie (pentru mucopolizaharide):** alcool etilic 96°, 90 ml; formol conc. neutralizat 10 ml. Durata fixării: 2—4 ore pentru probe de 2—3 mm.

4. **Amestecul Lillie (pentru glicogen, ARN):** alcool etilic absolut 85 ml; formol conc. 10 ml; acid acetic glacial 5 ml. Durata fixării: 24 ore la 0—5°C, pentru probe de 3 mm.

5. **Amestecul Clarke** (pentru acizii nucleici): alcool etilic 96°, 75 ml; acid acetic glacial 25 ml. Durata fixării: 1—2 ore la temperatura laboratorului sau 18 ore la 0°C.

6. **Amestecul Williams-Jackson** (pentru mucopolizaharide acide): alcool etilic absolut 50 ml; 5-aminoacridină hidroclorică 0,4 g; apă dist. 50 ml. Durata fixării la rece: 48 ore.

7. **Amestecul Newcomer** (pentru ADN): izopropanol 60 ml; acid propionic 30 ml; eter de petrol 30 ml; acetonă 10 ml; dioxan 10 ml. Durata fixării: 2—3 ore pentru probe de 3 mm şi 12—18 ore pentru cele de 5 mm.

Scanned with OKEN Scanner

8. **Amestecul Burstone** (pentru unele enzime pe frotiuri de sînge sau măduvă osoasă): acetonă diluată la 60° și tamponată la pH 4,2 cu tampon citrat. Durata fixării: 20—30 sec. la temperatura laboratorului.

f) Alți agenți fixatori cu unele aplicări în histochimie sînt:

1. **Amestecul Swank-Davenport** (pentru lipide și fosfolipide): sol. 1% clorat de potasiu 60 ml; formol conc. 12 ml; acid acetic 1 ml. Durata fixării: 6—10 zile.

2. **Amestecul Williams-Jackson** (pentru mucopolizaharide): clorură de cetylpiridină 0,5 g; formol conc. 10 ml; apă dist. 90 ml. Durata fixării: 48 ore.

3. **Amestecul Bouin „slab"** (pentru extragerea fosfolipidelor): sol. apoasă saturată de acid picric 50 ml; formol conc. 10 ml; acid acetic glacial 5 ml; apă dist. 35 ml. Durata fixării: 20 ore.

4. **Amestecul Sabatini-Bensch-Barrnett** (pentru unele activități enzimatice: sol. 25% hidroxiadipinaldehidă 1 p.; tampon fosfat 0,1 M la pH 7,2, 1 p. Se poate adăuga zaharoză în proporție de 7,5%. Durata fixării: 24 ore la +4°C pentru piese de 3—5 mm.

1. PRACTICA FIXĂRII

a) Durata fixării în diferitele lichide fixatoare este mult mai strictă în histochimie decît în histologie, deoarece ea este dictată nu numai de volumul și de natura probelor sau de viteza de penetrare a fixatorului, ci și de eventuala acțiune extractivă a fixatorului asupra anumitor componenți chimici.

Scanned with OKEN Scanner

Așa, de exemplu, fixatorul Carnoy este excelent pentru conservarea acizilor nucleici, dar dacă se prelungește acțiunea sa peste timpul prescris se va produce, datorită acidității sale, extragerea parțială a ARN și chiar a ADN. Sînt comparabile doar acele reacții, care au fost efectuate pe probe fixate în condiții identice din toate punctele de vedere.

b) VOLUMUL FIXATORULUI va fi întotdeauna suficient de mare, pentru a nu se produce diluarea agentului fixator prin apa din probe. Din același motiv, fixatorul va fi schimbat în decursul fixării de 1—2 ori.

c) TEMPERATURA FIXATORULUI influențează atît procesele de autoliză celulară, cît și viteza de penetrare a fixatorului. Dacă se fixează probe de dimensiuni mari la temperatura laboratorului va fi corespunzător fixată doar zona superficială, căci în profunzime se vor fixa celulele deja modificate de autoliză. Este deci preferabilă fixarea la rece (între 0°C și +4°C). Aceasta va necesita o prelungire corespunzătoare a duratei fixării, dar în schimb previne autoliza.

d) pH-UL ȘI TONICITATEA lichidelor fixatoare vor fi, atunci cînd este posibil, cît mai apropiate de valorile fiziologice. Acest lucru va asigura o păstrare mai fidelă a structurilor fine. În cazul fixatorilor anhidri doar solubili în apă, ca alcoolul etilic absolut, acetona anhidră ș.a., acest deziderat nu este realizabil și, de altfel, în aceste cazuri se și produc cele mai puternice deplasări ale apei din țesuturi, cu afectarea consecutivă a structurii și deplasarea anumitor substanțe. Utilizarea soluțiilor tampon nu este posibilă nici în cazul fixatorilor acizi care acționează și conservă anumiți componenți chimici

Scanned with OKEN Scanner

prin însăși aciditatea lor, chiar dacă aceasta se face parțial în dauna menținerii structurii.

În cazul fixatorilor apoși, tamponarea la pH-ul necesar (în general pH 7,2) este posibilă, dar se va avea grijă ca tamponul ales să nu conțină chiar ionii ce urmează să fie evidențiați, ca de exemplu un tampon cu fosfați în cazul evidențierii activității fosfatazelor. Molaritatea tamponului nu este nevoie să fie crescută, deoarece capacitatea sa de tamponare nu este solicitată din partea țesuturilor din secțiuni.

Izotonia nu are sens să fie realizată în cazul fixatorilor acizi, ci doar pentru fixatorii apoși la care s-a realizat și un pH fiziologic. Dizolvarea fixatorilor în ser fiziologic sau în soluții saline mai complexe rezolvă doar parțial problema deplasării apei din țesuturi, deoarece în acest proces mai intervine și presiunea coloidosmotică. Prin adaosul unor substanțe macromoleculare (albumină serică sau polivinilpirolidon) s-ar putea realiza valori fiziologice, dar aceste substanțe sînt puțin eficace, căci difuzează mai lent decît fixatorul. Se preferă deci adaosul de zaharoză în proporție de 7,5%.

2. FIXAREA CU VAPORI

Față de fixarea prin imersia probelor sau secțiunilor în lichide fixatoare, fixarea cu vaporii unor agenți fixatori volatili prezintă avantajul de a se evita solubilizarea unor anumiți componenți chimici de către solvenții apoși sau organici din lichidele fixatoare. În felul acesta, folosind substanțe volatile adecvate, au putut fi conservate corespunzător substanțe cu greutate moleculară mică: polipeptide, acizii nucleici și nucleotide, mono-, di- și polizaha-

Scanned with OKEN Scanner

ride, amine fluorescente, mucine etc. Cei mai utilizați fixatori în acest mod sînt: formaldehida, tetraoxidul de osmiu și glutaraldehida. Aceștia se aplică fie unor probe în prealabil tratate prin congelare-deshidratare, fie pe frotiuri sau secțiuni.

Vaporii de formaldehidă se obțin din paraformaldehidă, în etuvă, la 50—60°C, durata fixării fiind de aproximativ 3 ore.

Cristalele de tetraoxid de osmiu se volatilizează la temperatura de 37°C, fixînd în aproximativ 1 oră.

Glutaraldehida comercială, în sol. 25% trebuie în prealabil deshidratată: se amestecă glutaraldehidă sol. 25% în părți egale cu parafină lichidă grea, iar recipientul se trece pe un agitator automat timp de cîteva ore; după decantare se separă parafina, se centrifughează pentru separarea restului de apă, după care parafina lichidă conține aproximativ 10% glutaraldehidă. Cu aceasta se efectuează fixarea la 60°C, timp de 7 ore.

C. METODE SPECIALE PENTRU PRETRATAMENTUL PROBELOR

Metodele histologice obișnuite de pretratament al probelor (fixarea în fixatori topografici sau citologici, includerea în parafină sau celoidină, secționarea, etalarea secțiunilor etc.) nu vor fi prezentate în acest capitol, decît sub forma unor adaptări speciale pentru scopuri histochimice. Va fi descrisă în schimb, suficient de detaliat, metoda de obținere a secțiunilor subțiri, la microtomul cu congelare și

Scanned with OKEN Scanner

la criotom, metoda de congelare-deshidratare, congelare-substituție și unele tehnici speciale de includere, etalare, lipire și fixare a secțiunilor etc.

1. SECȚIONAREA LA MICROTOMUL CU CONGELARE

Este posibil să obținem secțiuni subțiri din probe nefixate sau fixate, doar dacă microtomul cu congelare obișnuit este prevăzut cu unele adaptări. În primul rînd este necesar un sistem de răcire a cuțitului pentru a preveni decongelarea secțiunilor. Este apoi necesar un dispozitiv care să prevină răsucirea sau ondularea exagerată a secțiunilor, astfel încît acestea să poată fi ușor culese de pe cuțit.

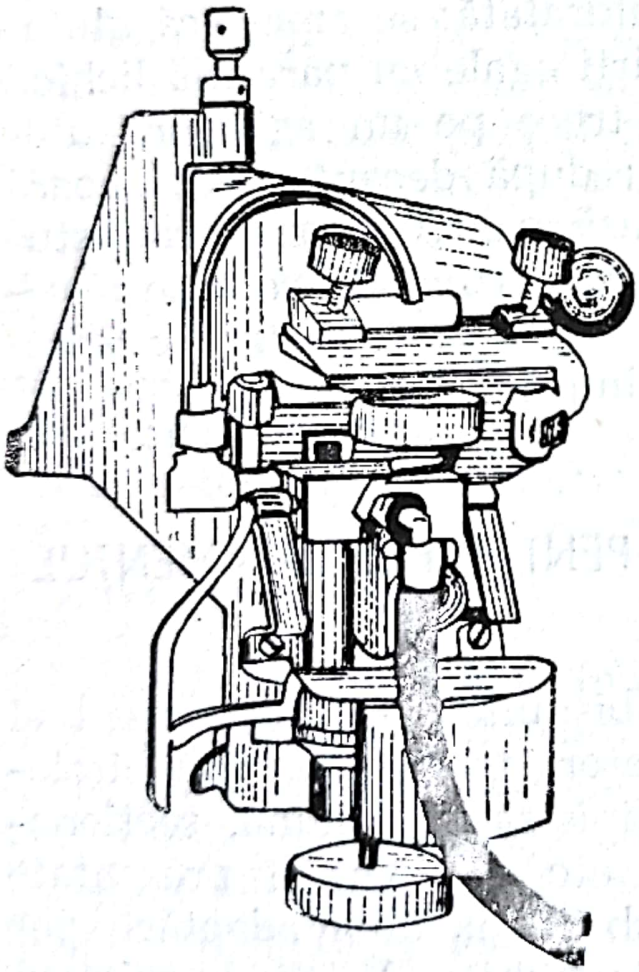


Fig. 2 — Microtom cu „cuțit rece", model MSE-Pelcool (după G. T. Gurr)

La unele tipuri de microtom (Leitz, Lipshaw ș.a.), răcirea cuțitului se face printr-o derivație a conductei pentru congelarea probelor, deci prin jet de acid carbonic (fig. 2). La tipurile de microtoame la care congelarea probelor se face cu termoelementi Peltier (Frigomat, Frigistor ș.a.), răcirea cuțitului se face prin același procedeu și gradul de răcire este

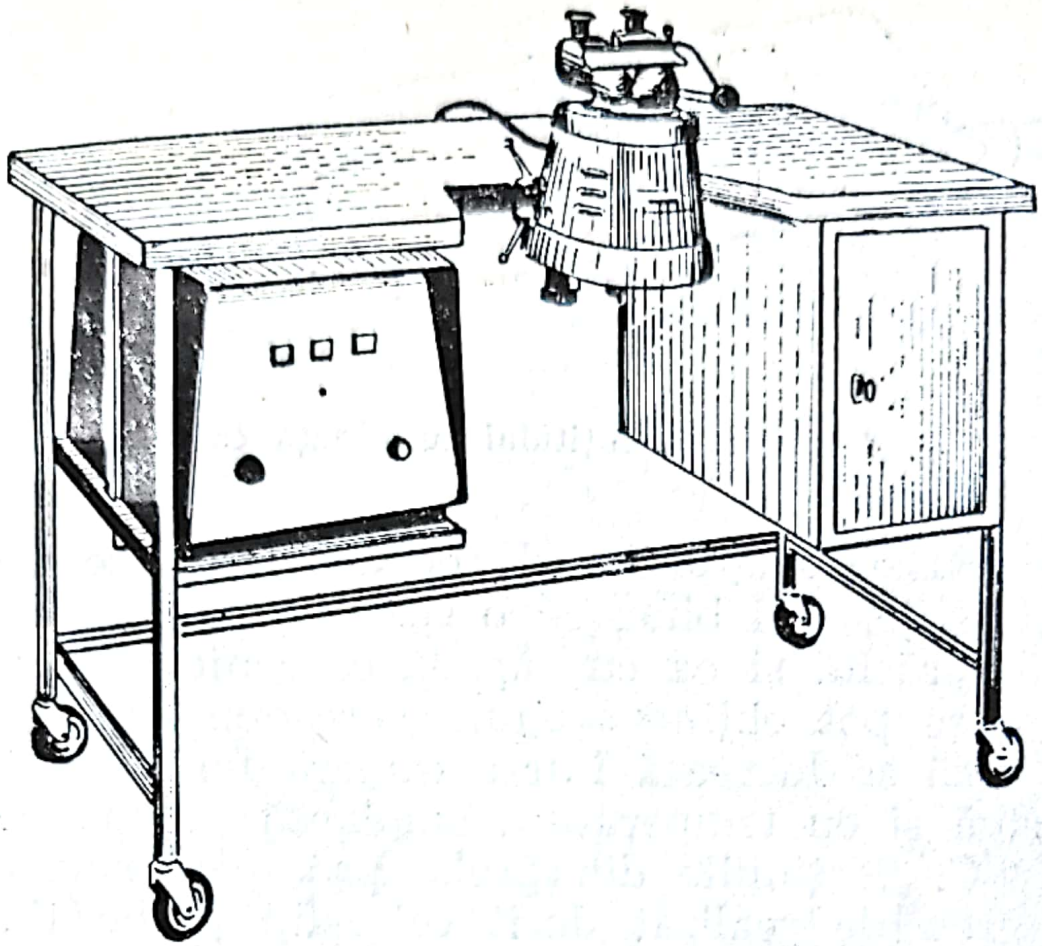


Fig. 3 — Microtom cu congelare prin termoelemenţi, model Frigomat-Jung (după H. C. B u r c k)

reglabil (fig. 3). În lipsa acestor aparate, răcirea se poate convenabil realiza şi la un microtom cu congelare obişnuit, prin menţinerea pe cuţit a unor bucăţi de gheaţă carbonică, cu ajutorul unei benzi adezive (fig. 4).

Răsucirea secţiunii se poate preveni prin dirijarea ei cu ajutorul unui penel cu păr fin sau mai bine cu ajutorul aşa-numitei plăci de ghidaj („anti-roll-plate"). Este vorba de plăci subţiri de sticlă fixate într-un suport metalic prevăzut cu posibilităţi de reglare a înălţimii şi înclinării plăcii faţă de cuţit, precum şi de înlăturare a plăcii, pentru a putea preleva secţiunea (fig. 5).

Scanned with OKEN Scanner

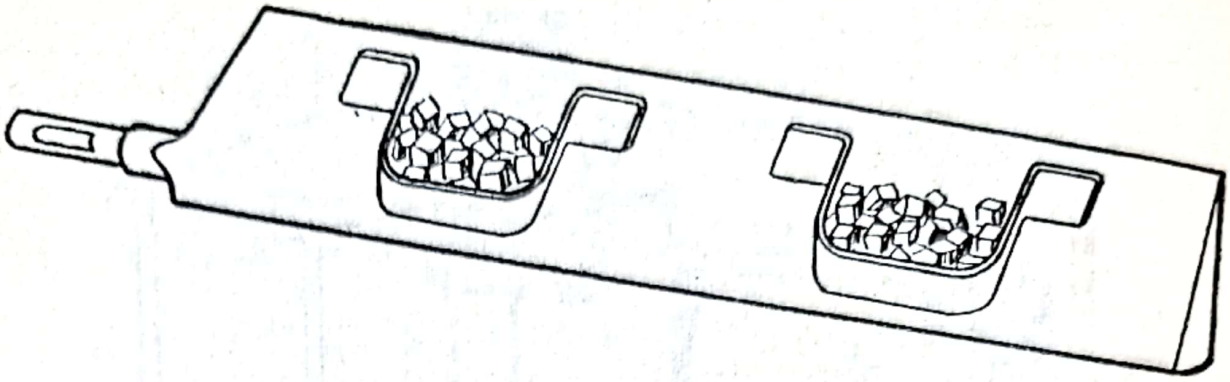


Fig. 4 — Răcirea cuțitului cu gheață carbonică

Prelevarea secțiunilor de pe cuțit se face fie cu penelul, fie, mai bine, cu o spatulă metalică foarte subțire, răcită și ea cu zăpadă carbonică. Cu acest sistem se pot obține secțiuni corespunzătoare, mai ales dacă se lucrează într-o cameră fără umiditate excesivă și cu temperatura ambiantă nu mai mare de 18°C. Secțiunile din probe proaspete sînt ceva mai greu de realizat decît cele din probe fixate.

Prelucrarea ulterioară a secțiunilor se face, după caz, fie trecîndu-le imediat (înainte de a se decongela) direct în fixator sau mediul de incubare, fie lăsîndu-le întîi să se usuce la temperatura camerei, după ce în prealabil au fost lipite direct („pe sec") pe lame date cu albumină-glicerină, acoperite cu

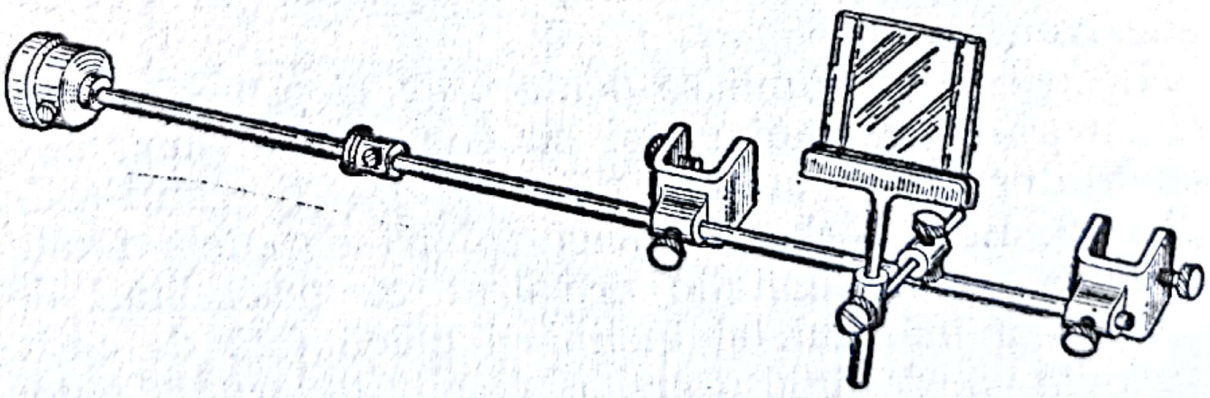


Fig. 5 — Placa de ghidaj („anti roll plate") și suportul ei

Scanned with OKEN Scanner

hîrtie de filtru şi comprimate uşor cu degetul. Precizăm în încheiere că acest mod de secţionare este potrivit doar pentru lucrările de rutină nu şi pentru lucrări de finețe, făcute în scop de cercetare.

2. SECŢIONAREA LA CRIOTOM (CRIOSTAT)

Deosebirea faţă de procedeul precedent constă în faptul că la acest aparat, tot procesul decurge neinfluenţat de temperatura ambiantă, iar cuţitul şi proba sînt menţinute la aceeaşi temperatură, de regulă la —12°C şi —22°C. Prin aceasta se poate ajunge la secţiuni de 5—10 microni, iar în condiţii speciale chiar de 1—2 microni.

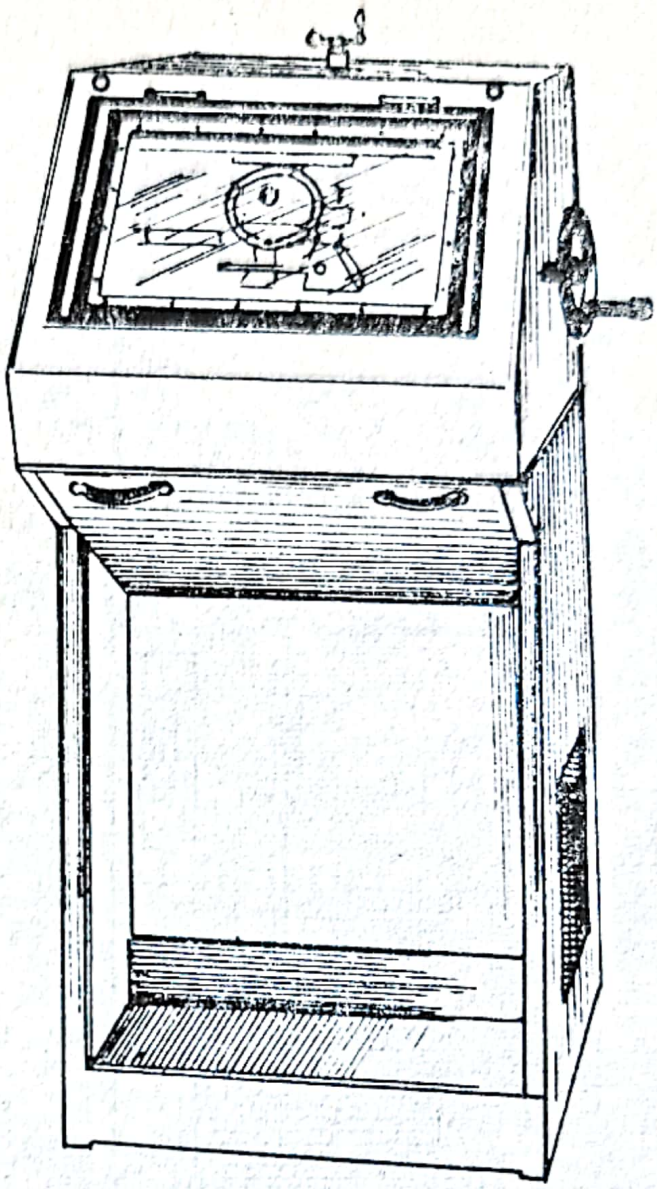


Fig. 6 — **Criostat model Slee HS cu microtom basculant, model Rocking (după A. G. E. Pearse, 1968)**

În esenţă, este vorba de un microtom obişnuit (rotativ sau basculant), amplasat într-o incintă izotermă răcită de către un agregat frigorific cu clorură de etil sau freon (fig. 6). Temperatura interioară este menţinută la nivelul dorit, printr-un sistem automat de termoreglare. Manevrarea micro-

Scanned with OKEN Scanner

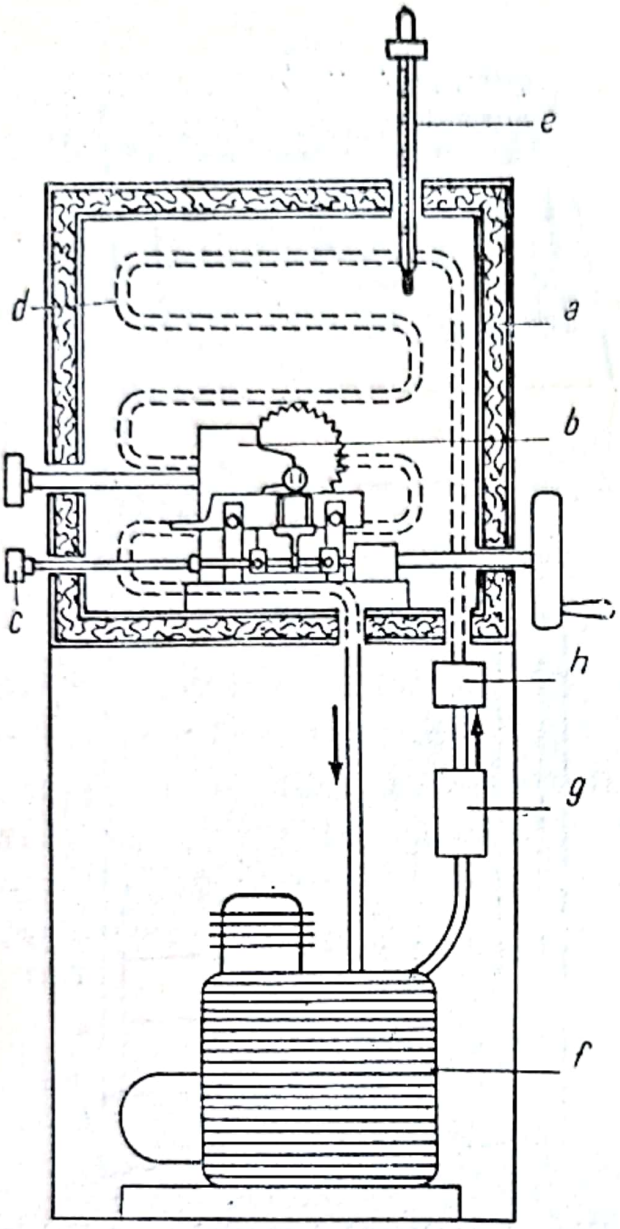


Fig. 7 — Schema unui criotom improvizat:

a — incinta termoizolantă; *b* — microtom rotativ; *c* — suportul plăcii de ghidaj; *d* — serpentine cu lichid refrigerent; *e* — termometru de contact conectat la releu; *f* — agregat frigorific cu clorură de etil sau Freon; *g* — filtru pentru deshidratare; *h* — ventil pentru reglaj termic

tomului se face din afară, manual sau automat, grație unui motor electric. Tot din afară se manevrează și placa de ghidaj. Un perete al incintei este transparent și rabatabil, pentru a avea un acces mai larg la microtom. De regulă, această ușă a criotomului este un geam dublu, între geamuri aflîndu-se spirele unei rezistențe electrice, a cărei încălzire previne aburirea geamului. În centrul geamului se află un hublou a cărui deschidere ne permite accesul la probă sau cuțit, fără a fi nevoiți să deschidem mereu ușa criotomului. Cu o investiție nu prea mare, construirea unui criotom este posibilă (fig. 7). Incinta izotermă va avea pereți metalici dubli, pentru a se putea face izolarea termică cu vată de sticlă. Dimensiunile incintei vor fi proporționate la cele ale microtomului.

Scanned with OKEN Scanner

Geamul dublu al ușii, precum și hubloul central se pot face din plexiglas (stiplex). Serpentinele refrigerente se fixează la pereții verticali ai incintei și se află conectate la un agregat frigorific de 1 000—2 000 Kcal. Pe traiectul conductei ce aduce lichidul refrigerent la serpentine se intercalează un filtru deshidrator și un ventil termostatic de reglaj. Menținerea constantă a temperaturii este asigurată de un termometru de contact cuplat la releul de pornire și oprire al motorului agregatului frigorific.

Microtomul poate fi unul obișnuit, de tip Minot, bine fixat în planșeul incintei și la care s-a prelungît axul roții volante, pentru ca manevrarea să se poată face din exterior. Tot în exterior se aduce șurubul de reglare al grosimii secțiunilor, precum și pîrghia de manevrare a plăcii de ghidaj. Pentru că microtomul nu a fost proiectat pentru temperaturi joase se va reajusta, după primele încercări, toleranța părților de frecare (sanie, bolțuri etc.), ungerea făcîndu-se numai cu uleiuri pentru temperaturi joase.

Suportul plăcii de ghidaj (fig. 5) trebuie să permită reglarea înălțimii, distanței și unghiului plăcii față de cuțit, iar aplicarea și îndepărtarea ei de cuțit să se facă din afară. Placa propriu-zisă este din sticlă subțire (0,5 mm), cu dimensiuni de aproximativ 30/30 mm. Distanțarea față de cuțit se face lipind pe cele două laturi verticale folie adezivă transparentă (fig. 8). Înainte de a întrebuința o

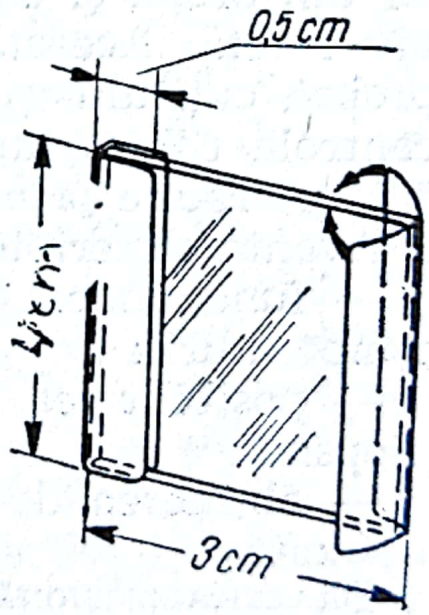


Fig. 8 — Prepararea plăcii de ghidaj cu folie adezivă

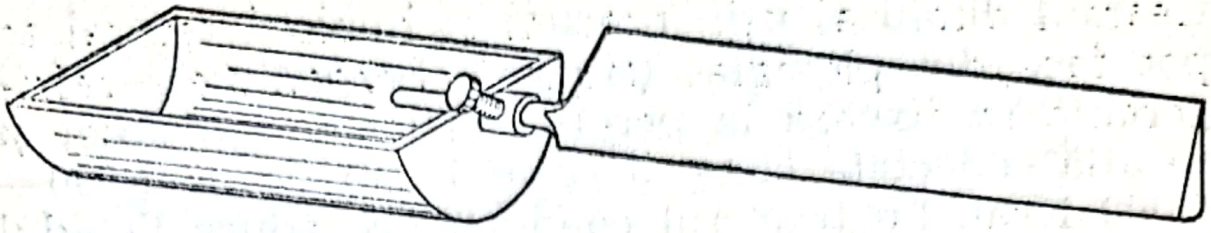


Fig. 9 — Cuvă pentru răcirea cuţitului cu zăpadă carbonică

placă, ea trebuie fin pulverizată cu Telfon-spray, pentru a-i reduce coeficientul de frecare.

Pentru a se putea secţiona în condiţii optime este necesar ca temperatura probei de ţesut şi a cuţitului să fie cît mai apropiate de —20°C. În acest fel se pot obţine din probe nefixate, secţiuni seriate de 8—30 microni. Dacă se coboară temperatura cuţitului pînă la aprox. —60°C cu gheaţă carbonică plasată într-o cuvă ataşată la mînerul cuţitului, atunci se pot realiza chiar secţiuni de 2—3 microni (fig. 9). În orice caz, temperatura incintei şi a cuţitului trebuie adaptată în funcţie de tipul ţesuturilor din probă şi de faptul dacă proba este proaspătă sau fixată. Această reglare a temperaturii incintei, probei, cuţitului şi chiar a plăcii de ghidaj, se poate controla corect numai la criotoamele moderne, bazate pe răcire prin termoelementi Peltier.

Avantajele criotomului sînt evidente:

— funcţionare continuă cu controlul automat al temperaturii;

— posibilitatea examinării rapide a materialului biopsic;

— obţinerea de secţiuni foarte subţiri din probe nefixate.

Practica secţionării la criotom. Probele de ţesuturi trebuie în prealabil congelate şi aceasta cît mai curînd după recoltare. Congelarea este corespunzătoare doar dacă se face extrem de rapid şi la

Scanned with OKEN Scanner

temperaturi foarte scăzute. Acest lucru se poate realiza în mai multe moduri:

1) congelare cu zăpadă carbonică pe suportul unui microtom clasic cu congelare. Se va acoperi întreg suportul cu un capac de material plastic, pentru ca zăpada carbonică ce se formează să acopere şi să congeleze proba rapid; 2) imersiunea probei în azot lichid; 3) imersiunea probei în izopentan răcit cu azot lichid.

Din aceste trei procedee, ultimul este cel mai recomandat. Primele două procedee sînt acceptabile numai pentru examinări de rutină, deoarece congelarea apei din ţesut nu se face suficient de rapid pentru a preveni formarea cristalelor mari de gheaţă care distrug ţesuturile şi produc în imaginea microscopică fenomenul numit **reticulare.** Cu toată temperatura scăzută a azotului lichid (—196°C), acesta nu congelează ţesuturile în mod corespunzător, din cauză că se produce un fenomen fizic numit fenomenul Leydenfrost. Este vorba de faptul că la introducerea în azot lichid a probelor care au temperatura mult mai ridicată (diferenţa de temperatură este de peste 200°C) se produce pe suprafaţa lor un strat izolant de bule gazoase care reduc mult conductibilitatea termică (fig. 10). Acest lucru se poate preveni dacă se introduc piesele în izopentan răcit cu azot lichid. Această hidrocarbură rămîne încă lichidă la —195°C şi are o foarte bună conductibilitate termică. Apa tisulară congelează în cîteva secunde sub formă de cristale submicroscopice (vitrificare), aşa încît deplasarea diferitelor substanţe şi distrugerea membranelor este prevenită.

Este practic în acest scop dispozitivul schematizat în figura 11. Acesta constă dintr-un recipient

Scanned with OKEN Scanner

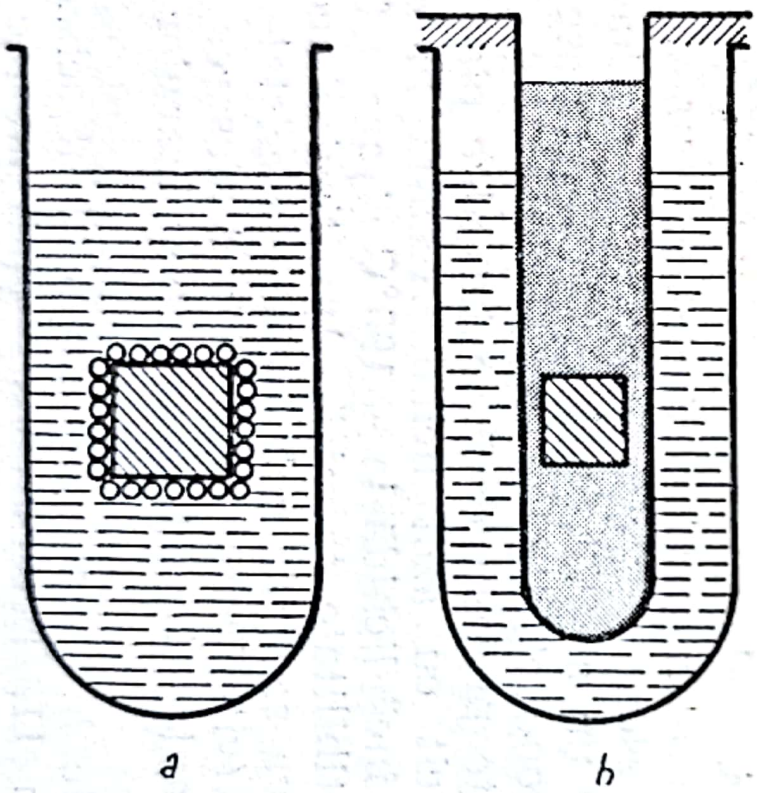


Fig. 10 — Schema procesului de congelare prin imersie directă în azot lichid (*a*) și prin imersie în izopentan răcit cu azot lichid (*b*) (după M. A r n o l d, 1968)

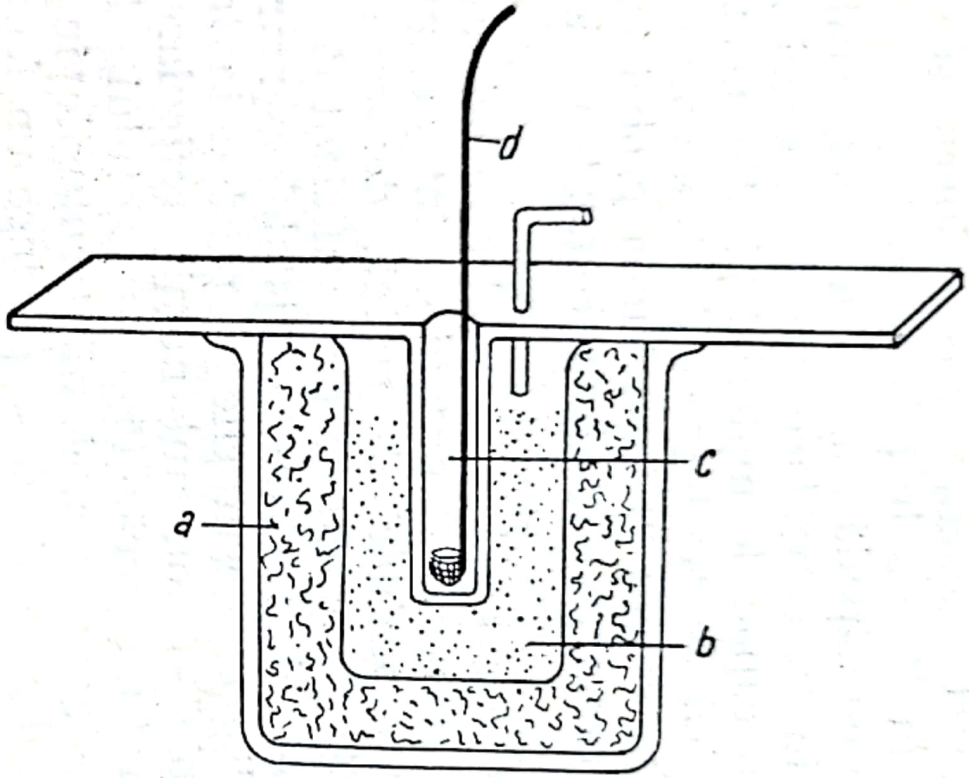


Fig. 11 — Dispozitiv pentru congelarea probelor cu izopentan-azot lichid (după L. S p a n n h o f, 1967); *a* — material termoizolant; *b* — azot lichid; *c* — izopentan; *d* — suport pentru probe

termoizolant, cu capacitatea de 300—500 ml acoperit cu o placă de alamă în centrul căreia se fixează un recipient cilindric din tablă subțire de alamă, avînd diametrul de 2—4 cm și adîncimea de 10—12 cm.

În recipientul mare se pune pînă la 2/3 din înălțime azot lichid, iar în tubul cilindric izopentan. Se introduce apoi încet tubul cu izopentan în azot lichid. Temperatura izopentanului va ajunge treptat pînă la —158,6°C, cînd devine vîscos, iar apoi îngheață. În acest caz se va scoate tubul cu izopentan și se va aștepta lichefierea lui la temperatura laboratorului, pînă în momentul în care mai există un rest de izopentan înghețat. Se reintroduce tubul în azot lichid și apoi se introduc imediat probele în izopentan, cu ajutorul unui coșuleț din plasă de cupru, suspendat de un mîner lung de sîrmă. Congelarea se va produce foarte rapid (10—15 sec.) după care, proba de țesut se ia cu o pensă răcită și se lipește pe port-obiectul microtomului, răcit și el la temperatura din incinta criotomului. Lipirea probei se face direct pe suport, eventual cu puțină apă. Dacă au fost congelate mai multe probe, acestea pot fi lăsate în așteptare chiar în incinta criotomului la —20°C. Pentru o durată de așteptare mai mare (1—2 zile), probele vor fi închise fie în cutii etanșe de aluminiu, fie în tuburi subțiri de polietilenă, lipite la ambele capete prin căldură. O păstrare mai îndelungată a probelor nu se poate face decît la —70°C, temperatură la care persistă chiar 1—2 ani. Secționarea propriu-zisă se va începe doar după ce am curățat bine cu pensula, atît cuțitul, cît și placa de ghidaj. Acest lucru se va face ori de cîte ori vaporii se condensează și îngheață pe suprafața acestora.

Scanned with OKEN Scanner

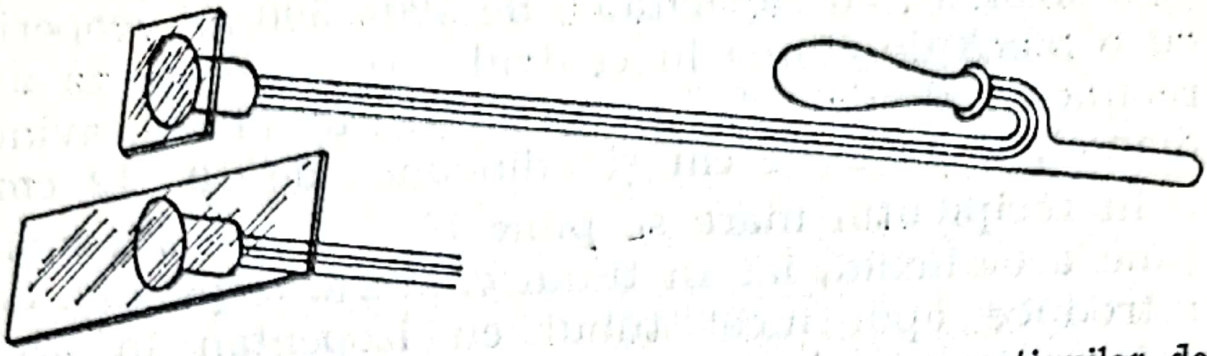


Fig. 12 — Dispozitiv cu ventuză pentru prelevarea secţiunilor de pe cuţitul criotomului (după A.G.E. Pearse, 1969)

Dacă s-a atins temperatura optimă a probei şi cuţitului şi dacă plasarea plăcii de ghidaj este corespunzătoare, atunci secţiunile se obţin în serii mai mici sau mai mari, în funcţie de grosimea în microni prestabilită. Ele rămîn congelate pe cuţit, de unde se pot preleva pe lamă sau lamele perfect degresate. Acestea se vor depune pentru răcire chiar în incinta criotomului, de unde se iau una cîte una, cu ajutorul unui ridicător cu ventuză de cauciuc, ca cel prezentat în figura 12. După îndepărtarea plăcii de ghidaj se apasă lamela sau lama peste secţiune, aceasta aderă de sticlă şi astfel poate fi trecută pentru prelucrare în continuare. Atunci cînd se lucrează cu lamele ţinute la temperatura laboratorului se va curăţa bine, de fiecare dată cuţitul şi placa de ghidaj, cu ajutorul pensulei.

Tratarea ulterioară a secţiunilor se poate face în mai multe moduri, în funcţie de reacţiile ce urmează să fie executate:

— secţiunile pot fi fixate imediat, fie cu un lichid fixator, fie cu vapori; uneori este necesar ca fixarea să se facă abia după decongelare şi uscare la temperatura laboratorului;

— secţiunile se trec, fără fixare, direct în reactiv sau în mediul de incubare; uneori acest lucru se

Scanned with OKEN Scanner

indică să fie făcut abia după uscarea lor la temperatura laboratorului;

— secţiunile se trec pentru tratare prin metode de congelare-deshidratare sau congelare-substituţie.

Pentru secţionarea la criotom a pieselor fixate cu formol se recomandă următoarea metodă: 1. fixare cu formol salin sau formol Baker (pag. 23) la rece; 2. spălarea probelor cu apă curgătoare 5—10 min; 3. sugativare minuţioasă a probelor cu hîrtie de filtru; 4. secţionare la criotom şi prelevarea secţiunilor pe lame date cu albumină-glicerină, după care se efectuează reacţiile dorite. În cazul că se doreşte evidenţierea activităţii unor enzime compatibile cu fixarea în formol se recomandă ca după punctul 2 să se treacă probele pentru 24 ore în soluţia de gumă-sucroză (gumă arabică 2 g; sucroză 60 g; apă dist. 200 ml), după care se continuă metoda de la punctul 3.

3. METODA DE CONGELARE-DESHIDRATARE (CRYO-DESSICATION, FREEZING-DRYNG, GEFRIERTROCKNUNG)

Consideraţii teoretice. Ca principiu metoda se bazează pe congelarea rapidă a probelor la temperatura de aprox. —160°C, urmată de o deshidratare sub vid, într-un exicator, la temperaturi mai ridicate (între —35°C şi —70°C). În aceste condiţii, apa tisulară trece direct din starea solidă în starea de vapori, pînă la deshidratarea completă. În acest moment, probele pot fi trecute direct în parafină topită şi apoi secţionate în modul obişnuit. Dat fiind faptul că prin congelarea rapidă la temperaturi foarte joase se evită utilizarea unui lichid fixator, iar prin deshidratare sub vid cea a unor lichide deshidra-

Scanned with OKEN Scanner

tante, se previne dizolvarea, deplasarea, denaturarea sau transformarea unor componente chimice și se asigură o foarte bună conservare a structurilor. Trebuie subliniat însă faptul că metoda de congelare-deshidratare nu este o metodă de fixare în înțelesul comun al cuvîntului, ci una de pretratament al țesuturilor, pentru diferite reacții histochimice.

PRACTICA METODEI DE CONGELARE-DESHIDRATARE. Metoda comportă trei timpi operatori: 1. congelarea; 2. deshidratarea; 3. confecționarea preparatelor microscopice.

1. **Congelarea probelor** trebuie efectuată imediat după recoltarea lor prin biopsie sau sacrificare. Din probele recoltate se vor tăia cu ajutorul unui brici foarte bine ascuțit, 4—6 felii nu mai groase de 1 mm. Dacă probele sînt de dimensiuni mai mari, congelarea va fi bună doar la suprafață, mediocră în profunzime și necorespunzătoare în zona intermediară. Extinderea acestor zone depinde și de conductibilitatea termică a țesuturilor. Probele astfel dimensionate se depun pe tot atîtea bucățele de folie de aluminiu (0,05 mm grosime) și sînt trecute astfel la congelare. Aceasta trebuie să se realizeze foarte rapid, în decurs de cîteva secunde, pentru a se evita artefactele de reticulare prin formarea de cristale mari de gheață. Oricum, unele mici modificări structurale datorate retractării țesuturilor (cu aprox. 2%) sub acțiunea refrigerării sînt iminente. Congelarea se face la temperaturi foarte coborîte, în lichide avînd o foarte bună conductibilitate termică. Imersia probelor direct în azot lichid este total contraindicată, (motivele au fost expuse la pag. 39). Azotul lichid se folosește doar pentru a răci alte lichide (de regulă

Scanned with OKEN Scanner

hidrocarburi) cu o conductibilitate mai bună. Cele mai indicate sînt următoarele: izopentan pur (—159°C), izopentan tehnic (—195°C), amestec de 3 p. propan cu 1 p. izopentan (—190°C), propan lichid (—185°C), Freon-12 (—158°C) și Freon-22 (—160°C). Acesta din urmă este considerat de către E. Pearse ca fiind cel mai rapid și cel mai sigur agent de congelare.

În mod practic congelarea se poate face într-un dispozitiv simplu, similar celui descris la pag. 32.

2. **Deshidratarea probelor** congelate se face în aparate speciale (cryo-desicator, liofilizator) care asigură controlul riguros al unor parametri ca: temperatura, presiunea atmosferică și umiditatea. Confecționarea lor prin mijloace proprii este un lucru dificil. Aceste aparate diferă mult ca principiu de construcție, așa că la descrierea lor ne limităm la date de ordin general. Firește că în privința modului lor de folosire primează indicațiile date de către firma producătoare. Dintre toate modelele existente, cele termoelectrice se bucură de cea mai mare apreciere.

În principiu, deshidratarea țesuturilor congelate are loc într-un spațiu închis, sub vid, unde transformarea directă a cristalelor de gheață în vapori (sublimare) se face cu absorbție de căldură din mediul înconjurător. Deshidratarea va interesa la început zona superficială a probelor și ea va progresa treptat spre zonele din profunzime. Temperatura probelor trebuie menținută tot timpul suficient de scăzută, pentru a nu avea loc reapariția fazei lichide în țesuturi. Se lucrează în general la temperaturi cuprinse între —36°C și —40°C, obținute cu diferite amestecuri de răcire sau cu termoelemenți Peltier.

Scanned with OKEN Scanner

Vaporii formaţi în profunzimea probei trebuie să răzbată prin stratul superficial deja deshidratat. Acest proces are loc numai dacă presiunea vaporilor în zonele profunde de uscare este mai mare decît cea de la suprafaţa probei. Se realizează acest lucru dacă se asigură, printr-un sistem oarecare, îndepărtarea vaporilor de apă de la suprafaţa probei pe măsură ce aceştia se produc. La diferitele tipuri de aparate existente, îndepărtarea vaporilor se face fie prin pompaj direct (cu pompe mecanice şi de difuzie), fie prin fixarea lor (chimică sau fizică) cu diferite substanţe higroscopice, fie mai ales prin condensarea lor la suprafaţa unui corp „capcană" cu temperatura foarte scăzută (răcit cu azot lichid) şi plasat foarte aproape de suprafaţa probei. La unele aparate aceste sisteme de înlăturare a vaporilor sînt combinate: „capcana" rece pentru prima perioadă a deshidratării şi pompa de difuzie pentru faza finală sau „capcana" rece şi o substanţă higroscopică, aşa cum se observă la schema aparatului Pearse-Edwards din figura 13. La acest aparat temperatura coborîtă a probelor este asigurată prin termoelemenţi. Peltier. Acest sistem prezintă un dublu avantaj: temperatura se poate regla cu uşurinţă, iar la sfîrşitul procesului, aceiaşi termoelemenţi furnizează (prin inversarea sensului curentului de alimentaţie) căldura necesară pentru includerea în parafină.

La sfîrşitul deshidratării probele prezintă un grad foarte redus de retractare faţă de volumul lor iniţial, sînt uşoare, gălbui, friabile şi foarte higroscopice. Proteinele tisulare sînt uscate dar nu denaturate şi dobîndesc o rezistenţă crescută faţă de căldură, fapt ce permite includerea în parafină fără inconveniente.

Scanned with OKEN Scanner

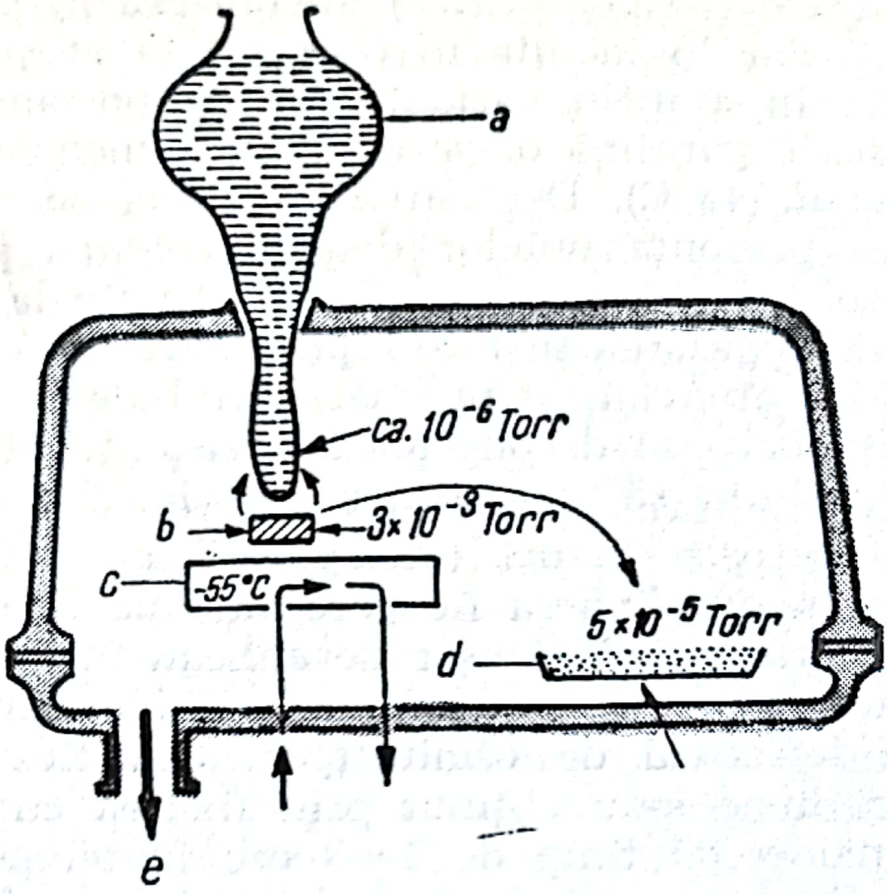


Fig. 13 — Schema aparatului pentru congelare-deshidratare, model Pearse-Edwards (după M. Arnold, 1968):

a — „deget" de răcire cu azot lichid; *b* — proba de țesut; *c* — termoelement Peltier; *d* — „capcană" cu P_4O_{10}; *e* — legătura cu pompa de vid

3. Confecționarea preparatelor microscopice:

a) **Includerea.** Dată fiind deshidratarea aproape totală a probelor, acestea pot fi foarte simplu incluse în parafină, fără ajutorul solvenților intermediari. Pentru aceasta, odată deshidratarea terminată, se lasă probele să se încălzească la temperatura laboratorului, menținîndu-se în tot acest timp vidul din sistem. Se permite apoi pătrunderea treptată a aerului, după care probele sînt trecute rapid într-o baie de parafină din etuva cu vid. La unele

Scanned with OKEN Scanner

liofilizatoare (termoelectrice), includerea în parafină se face chiar în incinta în care s-a făcut și deshidratarea. În ambele variante este important să se folosească o parafină degazată și cu punct de topire mai scăzut (42°C). Degazarea parafinei se impune, deoarece prezența bulelor de aer face ca probele, foarte subțiri și ușoare, să fie menținute la suprafața băii. Degazarea se face topind parafina în etuva cu vid, iar atunci cînd nu mai apar bule de aer, la suprafața băii, se deconectează rezistența etuvei și se lasă parafina să se solidifice sub vid.

În numeroase cazuri este posibil ca includerea probelor în parafină să fie precedată de fixarea lor cu agenți chimici. Mai ușor de aplicat, în acest caz, este fixarea cu vapori de formaldehidă, glutaraldehidă și tetraoxid de osmiu (pag. 31). Rezultatele cele mai bune s-au obținut prin fixarea cu vapori de formaldehidă timp de 1—3 ore la temperatura de 50—70°C, urmată de includerea în parafină. În acest mod s-a asigurat o excelentă conservare a structurii, precum și a constituenților chimici, secțiunile fiind corespunzătoare pentru marea majoritate a reacțiilor histochimice, cu excepția unor reacții histoenzimologice.

Este posibilă și fixarea prin imersie dar, în acest caz, agentul fixator trebuie dizolvat într-un solvent al parafinei (tetraoxidul de osmiu în benzen, formaldehida și glutaraldehida în eter anhidru sau parafină lichidă).

b) **Secționarea și etalarea secțiunilor.** Secționarea probelor incluse în parafină se face în mod obișnuit. Etalarea secțiunilor ridică însă o serie de probleme și ea se face în moduri diferite, în funcție de natura substanțelor ce urmează să fie evidențiate.

Scanned with OKEN Scanner

Atunci cînd acestea sînt uşor solubile sau evidenţierea lor este incompatibilă cu fixarea chimică, se recurge la etalarea uscată a secţiunilor sau la etalarea pe lichide inerte.

Etalarea uscată se practică astfel: secţiunile — dacă nu sînt prea încreţite — se depun pe o lamă albuminizată şi puţin încălzită, se acoperă cu hîrtie de filtru şi se presează uşor cu degetul. Secţiunile încreţite se pot întinde — înainte de a fi puse pe lamă — cu ajutorul unui penel cu păr fin. Se mai poate obţine întinderea lor prin atîrnarea panglicii de parafină în etuvă, la 40°C, unde s-a pus din timp un vas cu clorură de calciu anhidră spre a preveni hidratarea secţiunilor.

Etalarea pe lichide inerte se face depunînd secţiunile pe ulei mineral sau mercur (vaporii de mercur sînt toxici!), încălzit la aproximativ 45°C, iar de aici se culeg pe lame albuminizate şi se presează uşor sub hîrtie de filtru.

În toate cazurile, după etalarea şi lipirea secţiunilor pe lamă, îndepărtarea parafinei se face de preferinţă cu eter de petrol, izopentan sau chiar cu benzen sau xilen. Eliminarea solventului parafinei nu se va face cu alcool, ci prin evaporare la temperatura laboratorului. Pe asemenea secţiuni care nu au venit în contact cu nici un agent fixator chimic se pot aplica mai cu seamă acele reacţii histochimice în care produsul vizibil al reacţiei apare imediat. Altfel există pericolul deplasării prin difuziune a substanţelor cercetate.

Atunci cînd substanţele pe care le evidenţiem nu suferă modificări prin fixare cu fixatori lichizi este posibil să se efectueze *etalarea secţiunilor la cald*, folosind în loc de apă distilată chiar lichidul fixator. Se poate utiliza în acest scop alcoolul etilic de 70°,

Scanned with OKEN Scanner

alcool-formol, formolul Baker ș.a. Fixarea se mai poate realiza, în cazul utilizării de fixatori apoși și prin imersie în lichidul fixator, după ce în prealabil s-a făcut etalarea și lipirea uscată, deparafinarea și evaporarea solventului parafinei. Cînd fixatorul ales este alcoolul sau acetona, secțiunile se trec din ultima baie cu solvent al parafinei direct în fixator.

L. Spanhof recomandă fixarea la rece (+4°C) practicată pe secțiuni nedeparafinate: panglica cu secțiunile se depune pe suprafața lichidului fixator conținut într-o placă Petri; periodic se va umecta cu fixator și suprafața superioară a secțiunilor. Autorul recomandă chiar ca reacțiile histochimice să se facă în continuare tot în acest fel, pe secțiuni nedeparafinate și abia la sfîrșit să se culeagă secțiunile pe lame albuminizate. După uscare, prin sugativare cu hîrtie de filtru, se poate efectua deparafinarea și montarea. În felul acesta s-au putut evidenția în mod corespunzător chiar și unele activități enzimatice (fosfataza alcalină și acidă, esterazele nespecifice ș.a.).

În cazul în care fixarea probelor tratate prin congelare-deshidratare s-a făcut încă înainte de includere (fixare cu vapori) etalarea secțiunilor se poate face în modul obișnuit, la cald, cu apă distilată.

Alegerea variantei tehnice. Alegerea modalității de prelucrare a probelor tratate prin congelare-deshidratare (secțiuni din probe nefixate, secțiuni din probe fixate înainte de includere și fixate după secționare) este dictată de natura examinărilor sau a reacțiilor histochimice care urmează să fie efectuate.

1. **Secțiunile din probe nefixate** sînt potrivite pentru examinarea în contrast de fază, lumină polarizată, ultra-violet și la microscopul cu

Scanned with OKEN Scanner

cîmp întunecat. Ca mediu de montare se poate utiliza glicerina (cu sau fără deparafinarea secţiunilor) sau mai bine, Nonan sau parafină lichidă, substanţe care şi dizolvă parafina. Acest fel de secţiuni mai sînt recomandate pentru procedeele de estimare a zonei punctului izoelectric al proteinelor tisulare. În această privinţă trebuie însă precizat faptul că, o anumită transformare a proteinelor are loc chiar sub acţiunea procesului de congelare-deshidratare. Aceste secţiuni sînt de asemenea adecvate pentru metodele de extracţie a lipidelor, pentru studiul repartiţiei coloranţilor vitali coloidali şi mai cu seamă, pentru histochimia substanţelor anorganice (prin microincinerare sau reacţii chimice), precum şi pentru metoda autohistoradiografică, în cazurile în care substanţele marcate sînt solubile în lichidele de fixare.

2. Secţiunile din probele congelate-deshidratate fixate înainte de includere sînt adecvate pentru evidenţierea unor activităţi enzimatice, numai atunci cînd fixarea s-a făcut cu lichide fixatoare. Fixarea făcută cu vapori de formaldehidă sau glutaraldehidă s-a dovedit a fi procedeul ideal pentru evidenţierea mucoproteinelor, mucopolizaharidelor, glicogenului şi acizilor nucleici.

3. În cazul în care fixarea se face pe secţiuni (deparafinate sau nu), alegerea fixatorului este dictată de scopul propus. Fixarea cu alcool etilic de 70—80° timp de 16—24 ore este recomandată pentru studiul unor proteine simple sau al aminoacizilor, precum şi pentru examinări morfologice prin colorăţii uzuale topografice sau citologice. Fixarea cu alcool sau acetonă anhidră permite o bună evidenţiere a unor activităţi enzimatice (fosfataze, peptidaze, colinesteraze specifice). În cazul mucopolizaharidelor şi

Scanned with OKEN Scanner

mucoproteinelor, acești fixatori sînt ineficace, deoarece nu le insolubilizează pentru a putea rezista la tratamentul cu reactivi apoși. Dimpotrivă, fixarea cu formol 10% timp de 10—16 minute poate conserva unele mucopolizaharide și mucoproteine mai greu solubile.

Glicogenul este foarte bine conservat prin congelare-deshidratare (fără deplasări intracelulare) și colorarea lui se poate face în bune condiții după fixarea secțiunilor cu alcool etilic absolut și protejarea glicogenului prin colodinare.

În concluzie trebuie arătat că metoda de congelare-deshidratare prezintă avantaje incontestabile, dar și unele inconveniente.

Avantajele constau, pe de o parte din excelenta conservare a structurilor, echivalentă cu cele mai bune fixări citologice, iar pe de altă parte din faptul că, în general, nu modifică nici chimic și nici topografic constituenții chimici din țesuturi.

Dintre dezavantaje semnalăm în primul rînd necesitatea de a prelucra doar probe de dimensiuni foarte mici, căci altfel artefactele de reticulare sînt inevitabile. Chiar și cînd se respectă această condiție s-a constatat că pe unele organe se obțin rezultate excelente (ficat, pancreas, piele), pe altele satisfăcătoare (rinichi, intestin), iar pe altele puțin satisfăcătoare (testicul, țesut nervos, măduvă osoasă, limfoganglion). S-a constatat apoi că însăși procesul de congelare-deshidratare poate cauza un anumit grad de difuziune al unor substanțe sau poate produce denaturarea unor proteine și lipoproteine. În plus, metoda este laborioasă (cere o supraveghere continuă și îndelungată) și destul de costisitoare.

Pentru aceste considerente, tratarea probelor prin congelare-deshidratare nu trebuie considerată ca o

Scanned with OKEN Scanner

metodă menită să înlocuiască toate procedeele fixării chimice, ci aplicarea ei trebuie rezervată doar pentru cazurile în care fixarea chimică este într-adevăr contraindicată.

4. METODA DE CONGELARE-SUBSTITUȚIE
FREEZE (SUBSTITUTION; CONGELATION-DISSOLUTION; GEFRIERAUSTAUSCH)

Considerații teoretice. Principiul acestei metode este foarte apropiat de cel al metodei de congelare-deshidratare, rezultatele în ce privește imobilizarea și conservarea substanțelor chimice din țesuturi sînt aproape echivalente și, în plus, metoda este mult mai simplă sub aspect tehnic, accesibilă și incomparabil mai ieftină.

Primul timp al metodei, congelarea, se practică la fel ca la metoda precedentă, cu aceleași restricții în ce privește dimensiunile probelor. Al doilea timp, deshidratarea, se bazează însă pe alt principiu: probele congelate sînt transferate într-un lichid organic, de regulă anhidru, cu o temperatură între —20°C și —80°C unde, prin dizolvarea treptată a gheții, moleculele de apă din țesuturi vor fi transferate în lichidul de deshidratare, fără ca apa din țesuturi să se mai reîntoarcă la starea lichidă (fig. 14). În principiu, este vorba de un echilibru ce se stabilește, la temperaturi joase, între faza solidă reprezentată de gheață și faza lichidă reprezentată de apă și solventul organic (de exemplu alcool etilic). Astfel, la o temperatură de —20°C echilibrul între faza solidă și faza lichidă este atins atunci cînd în faza lichidă alcoolul ajunge la concentrația de aproximativ 30%. Dacă probele congelate sînt puse

Scanned with OKEN Scanner

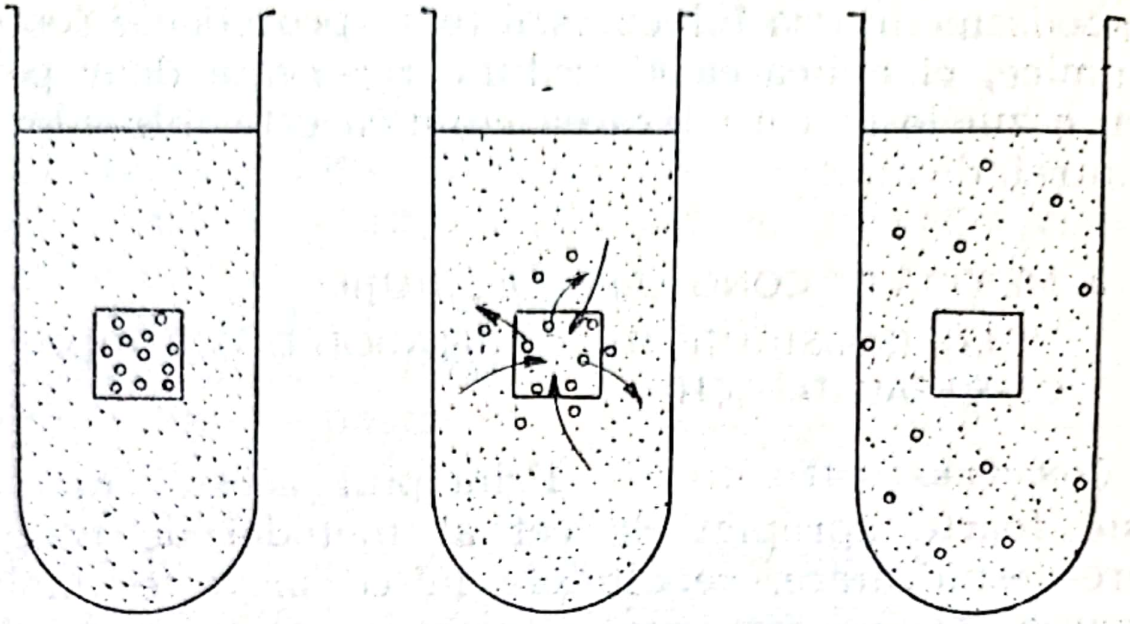


Fig. 14 — **Schema deshidratării probelor de țesut prin procesul de congelare-substituție (după M. A r n o l d, 1968)**

în alcool absolut, la aceeași temperatură, apa va fi extrasă pînă cînd concentrația alcoolului va scădea la 30%, fapt care, în condiții corecte de lucru, nu se poate întîmpla.

După deshidratare, probele și lichidul de deshidratare sînt readuse la temperatura laboratorului, iar apoi sînt trecute la includerea obișnuită în parafină.

Două aspecte referitoare la mecanismul procesului de congelare-substituție sînt importante pentru practica histochimică: primul se referă la faptul că pe tot parcursul deshidratării coexistă în țesuturi faza solidă și cea lichidă a apei, deci anumite deplasări de substanțe sînt posibile; în al doilea rînd, trebuie precizat că, în realitate, este vorba de un proces de fixare chimică, chiar dacă temperatura coborîtă la care decurge reduce în mare măsură acțiunea multor fixatori. Și oricum, majoritatea lichidelor deshidratante își vor exercita efectul de

Scanned with OKEN Scanner

fixare atunci cînd se revine la temperatura laboratorului. Din această cauză s-a preconizat introducerea unor agenţi chimici fixatori, chiar în lichidul de deshidratare, pentru ca aceste două procese să decurgă concomitent.

Cu toate acestea s-a dovedit prin numeroase cercetări experimentale cantitative, că deshidratarea la temperaturi coborîte nu determină decît o minimă denaturare a proteinelor. În consecinţă, este posibilă evidenţierea corespunzătoare a numeroase activităţi enzimatice.

PRACTICA METODEI DE CONGELARE-SUBSTITUŢIE

a) **Congelarea** probelor se face în acelaşi mod ca în cazul metodei de congelare-deshidratare (pag. 39, 44). Cu cît probele vor avea dimensiuni mai mici, cu atît structura ţesuturilor va fi mai puţin afectată prin formarea cristalelor mari de gheaţă. În general nu se va depăşi grosimea de 3 mm.

b) **Substituţia.** Există numeroase variante tehnice pentru acest proces şi după cum se vede în tabelul 1, ele diferă prin compoziţia mediului de substituţie şi prin temperatura la care aceasta are loc. După cum se vede, temperaturile variază în funcţie de metodă, între —20°C şi —130°C dar că, în general, se lucrează la temperaturi cuprinse între —40°C şi —70°C. Acestea se pot realiza uşor prin diferite amestecuri de răcire pe bază de gheaţă carbonică şi solvenţi organici: cu alcool (—78°C), acetonă (—70°C), oxalat de etil (—40°C), fenol (—34°C), Nonan (—53°C) ş.a.

Probele, imediat după congelare, sînt trecute în lichidul de substituţie adus deja la temperatura necesară. Durata deshidratării este destul de lungă (aproximativ 7 zile în cazul alcoolului şi acetonei la —70°C), deoarece penetrarea lichidului de sub-

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 1

Variante tehnice pentru metode de congelare-substituţie
(după E. Pearse)

Autorul (ii)	Amestecul de congelare	Amestecul de substituţie	Temperatura în timpul substituţiei
1. Simpson (1941)	Izopentan/azot lichid	Alcool etilic sau metil-cellosolve	—40 °C la —78 °C
2. Lison (1949)	Izopentan/azot lichid	Alcool etilic sau lichidul Geandre	—40 °C
3. Rossell şi col. (1949)	Izopentan/azot lichid	Alcool etilic cu săruri metalice	—78 °C
4. Blank şi col. (1951)	Propilen-glicol la —20 °C	Propilen-glicol	—20 °C
5. Persson (1952)	Izopentan/azot lichid	Alcool etilic şi alcool metilic 1 : 1	—31 °C
6. Baud (1952)	Izopentan/azot lichid	Alcool-acid acetic	—40 °C
7. Gourevitsch (1953)	Alcool etilic la —65 °C	Alcool etilic	—20 °C

Scanned with OKEN Scanner

8. Woods—Pollister (1955)	Izopentan/azot lichid	Alcool etilic	—41 °C la —45 °C
9. Peyrot (1956)	Acetonă/CO_2	Lichidul Rossman	—60 °C la —65 °C
10. Hancox (1957)	Izopentan/azot lichid	Alcool-n butilic	—38 °C
11. Feder—Simon (1958 a)	Acetonă/CO_2	Tetraoxid de osmiu-acetonă	—70 °C
12. Feder—Simon (1958 b)	Propan-izopropan azot lichid	Sublimat-alcool etilic	—70 °C
13. Fernandez—Moran (1960)	Heliu II lichid	Acetonă-alcool etilic	—80 °C la —130 °C
14. Rebhun (1961)	Freon-12/azot lichid	Tetraoxid de osmiu-acetonă	—80 °C
15. Rebhun—Gagne (1962)	Propan/azot lichid	Acetonă-alcool etilic	—108 °C
16. Bartl (1962)	Izopentan/azot lichid	Etilen glicol monometilacrilat	—65 °C la —80 °C

Scanned with OKEN Scanner

stituție este mult redusă din cauza temperaturii (aproximativ 0,55 mm/zi). Deshidratarea va decurge în condiții mai bune dacă lichidul de substituție va fi împrospătat de cîteva ori și dacă periodic se agită recipientul cu probele. Unii autori au adaptat chiar un sistem mecanic automat de agitare continuă pe toată durata substituției. Depunerea pe fundul recipientului în care are loc substituția a unei cantități de substanță chimică higroscopică (sulfat de sodiu anhidru), are sens mai ales atunci cînd se lucrează cu cantități mici de lichid, pentru a evita împrospătarea lui periodică.

În unele cazuri, metoda de congelare-substituție este mai avantajos să fie aplicată nu pe probe (blocuri) de țesut, ci pe secțiuni făcute la criotom.

În țesuturile tratate cu metoda de congelare-substituție se observă o foarte bună menținere a structurii citologice, însoțită de o conservare adecvată a foarte numeroși componenți chimici. Prin substituția cu acetonă sau acetonă-tetraoxid de osmiu s-au putut ulterior evidenția numeroase activități enzimatice: fosfataza alcalină și acidă, succindehidrogenaza, adenozintrifosfataza, aminopeptidaza, precum și unele dehidrogenaze și diaforaze. Eventualele pierderi de proteine-enzime nu au loc atît în cursul substituției, cît mai ales în decursul prelucrării ulterioare a secțiunilor, prin dizolvare în medii apoase (etalarea secțiunilor pe apă, incubare etc.).

Conservarea acizilor nucleici (chiar fără asocierea fixării) este foarte bună, la fel ca și cea a glicogenului (mai ales dacă substituția se face în lichidul Geandre sau Rossman). Metoda mai este aplicabilă pentru obținerea de autohistoradiografii, atunci cînd radioizotopii sînt hidrosolubili sau pentru metodele

Scanned with OKEN Scanner

cu anticorpi fluorescenţi. În schimb, metoda nu este aplicabilă la studiul lipidelor, deoarece acestea sînt extrase de către solvenţii organici utilizaţi. Totuşi fosfolipidele, din cauză că sînt mai greu solubile în alcool sau acetonă, pot fi evidenţiate, mai ales dacă se adaugă în lichidul de substituţie nitrat de uranil şi cloral hidrat.

Tratarea țesuturilor cu metoda de congelare-substituție. Se poate face în patru moduri: a. fără fixare; b. cu fixare concomitentă cu substituţia; c. cu fixare ulterioară d. congelare-substituţie pe secţiuni.

a) **Congelare-substituţie fără fixare:** 1. congelare în izopentan răcit cu azot lichid; 2. substituţie cel puţin 24 ore cu alcool n-butilic răcit cu amestec de acetonă-zăpadă carbonică; 3. se trec probele în două băi de alcool n-butilic, de 6 ore fiecare, la —44°C; ultima baie se lasă să ajungă la temp. laboratorului, iar de aici probele se includ în parafină.

Deoarece proteinele n-au fost denaturate, ele pot fi solubilizate în medii apoase, fapt ce impune tratarea secţiunilor ca în cazul celor preparate prin congelare-deshidratare (pag. 48). Solubilizarea proteinelor mai poate fi prevenită prin etalarea secţiunilor pe alcool etilic de 80°, dar în acest caz se produce şi denaturarea lor.

b) **Congelare-substituţie concomitentă cu fixarea. Metoda Feder-Sidman:** 1. probe de 1—3 mm, lipite pe folie de aluminiu, se congelează 30—60 sec. în izopentan răcit cu azot lichid sau orice alt amestec echivalent; 2. substituţie la —70°C, timp de 2—7 zile, în lichide simple ca alcool absolut, acetonă anhidră sau amestecuri fixatoare. Se pot utiliza, în funcţie de natura cerce-

Scanned with OKEN Scanner

tării, următoarele amestecuri: sol. 1% acid cromic în acetonă; sol. 1% sublimat în alcool absolut; sol. 5% acid picric în alcool absolut; sol. 1% acid osmic în acetonă; sol. 2% trioxid de crom în acetonă; amestec Geandre (pag. 27); amestec Rossman (sol. saturată de ac. picric în alcool absolut 90 ml; formol conc. 10 ml) etc. (vezi și tabelul 1); 3. dacă lichidul de substituție a conținut și o substanță fixatoare, se impune spălarea probelor, tot la —70°C, cu 2 băi din solventul utilizat (alcool, acetonă etc.) timp de 4—6 ore; 4. se trec băile în frigider pînă cînd temperatura lor se ridică la +4°C, după care probele se trec în trei băi de alcool absolut, de 8 ore fiecare; 5. trei băi, de 6 ore fiecare, în cloroform anhidru, primele două la +4°C, iar ultima la temp. laboratorului; includerea în parafină de 52°C, două băi de 15 min. în etuva cu vid. Includerea se poate practica și în polietilen-glicoli („Carbowax") iar secționarea la un microtom cu congelare prin termoelement, tip Frigomat.

Metoda Lison, modificată de Peyrot, pentru glicogen: 1. probe de dimensiuni foarte mici se congelează în acetonă anhidră saturată cu gheață carbonică (—80°C); 2. se trec probele pentru 24—36 ore în amestecul Rossman (pag. 60) menținut între —60°C și —65°C, după care se aduce treptat la temp. laboratorului; 3. deshidratare în trei băi de alcool absolut, clarificare și includere în parafină. Înainte de colorare se recomandă colodinarea secțiunilor (pag. 71).

Metoda Blank-McCarthy-Lamater pentru lipide: 1. probe de 2—3 mm se introduc în propilen-glicol la —20°C pentru minimum 2 ore după care se lasă să ajungă la temp. laboratorului; 2. infiltrare 2—3 ore la 55°C într-un amestec format din 9 p. Carbo-

Scanned with OKEN Scanner

wax 4000 și 1 p. Carbowax 1500, după care se lasă să se solidifice la rece.

c) **Congelare-substituție cu fixare ulterioară** (L. Spannhof): 1. congelare cu izopentan-azot lichid; 2. substituție cu acetonă la —60°C timp de 4—6 zile; 3. fixare timp de 1—3 zile, tot la —60°C în amestecul Carnoy (pag. 27) sau alcool etilic absolut conținînd 1% acid picric, 2,5% acid tricloracetic și 1% acid acetic.

d) **Congelare-substituție pe secțiuni** (după E. Pearse): 1. probe de 1—2 mm se congelează cu izopentan răcit cu azot lichid; 2. se efectuează secțiuni de 8—10 microni la criotom; 3. secțiunile se transferă de pe cuțit direct într-un recipient, prevăzut cu dop etanș, care conține acetonă anhidră la —70°C, unde se mențin 12 ore; 4. se culeg secțiunile pe lamele reci cu ajutorul unui ac de sticlă; 5. se face imediat colodinarea secțiunilor cu o sol. 1% celoidină dizolvată într-un amestec format din 30 ml alcool etilic absolut, 30 ml eter anhidru și 40 ml acetonă anhidră, răcit la —70°C. Această metodă asigură o excelentă conservare structurală, precum și a numeroase componente chimice, inclusiv enzimele.

D. DECALCIFICAREA ÎN SCOPURI HISTOCHIMICE

Prelucrarea țesuturilor calcificate (os, dinte, aortă ateromatoasă etc.) implică atît pregătirea probelor în vederea secționării, cît și conservarea acceptabilă a unui număr cît mai mare de componenți chimici. Metodele de decalcificare utilizate în scopuri morfologice recurg în general la acizi organici

Scanned with OKEN Scanner

puternici, lucru incompatibil cu majoritatea reacţiilor histochimice. În scopuri histochimice se recurge mai ales la decalcificarea cu acizi organici în soluţii tampon, agenţi chelatori şi răşini schimbătoare de ioni.

Fixatorul va fi ales în funcţie de reacţia histochimică ce se efectuează. Pentru enzime se recomandă formol salin 10%, formol Baker (pag. 23), formol-piridină Danielli (alcool 70°, 80 ml; piridină 20 ml; formol conc. 4 ml), alcool absolut şi acetonă anhidră. Ultimii doi fixatori sînt recomandaţi cînd se face includerea în parafină. Indiferent de fixatorul ales, durata fixării va fi de cel mult 24 ore (probe de dimensiuni mici!) şi se va face la frigider, între 0°C şi +4°C.

Durata decalcificării depinde de dimensiunile probelor, natura şi temperatura decalcificatorului, frecvenţa împrospătării lui etc. Sfîrşitul decalcificării se poate aprecia prin radiografie sau printr-un procedeu chimic: se iau într-o eprubetă 5 ml de lichid decalcificator (pe bază de acizi organici) şi se neutralizează cu cîteva picături dintr-o sol. de NaOH; se adaugă 1 ml sol. 5% oxalat de sodiu sau amoniu; dacă nici după 5 minute soluţia nu devine tulbure prin formare de oxalat de calciu, înseamnă că decalcificarea s-a terminat.

Probele decalcificate pot fi tratate prin congelare-deshidratare sau pot fi secţionate la criotom sau la microtomul cu congelare, fixarea făcîndu-se în toate cazurile pe secţiuni, cu formol 10% rece. După spălarea fixatorului cu apă curentă, secţiunile pot fi trecute în mediile de incubare sau alţi reactivi.

Pentru includerea în parafină a probelor fixate cu alcool sau acetonă, deshidratarea se face tot la rece, în 3 băi de alcool absolut respectiv acetonă,

Scanned with OKEN Scanner

care să nu depășească în total 12—18 ore. Secționarea se va face mai bine dacă se precede clarificarea de o impregnare a probelor, tot la rece, timp de 12 ore în sol. de celoidină 1%, într-un amestec în părți egale de alcool absolut-eter, respectiv eter-acetonă anhidră.

Clarificarea probelor deshidratate cu alcool se face timp de 1—2 ore în trei băi de benzen, iar cele tratate cu acetonă pot fi trecute direct în parafină. Durata impregnării cu parafină la cald se va scurta la maximum posibil recurgînd la etuva cu vid. Este mai indicată o parafină cu punct de topire mai coborît (40—52°C). Blocurile care nu se secționează imediat vor fi păstrate în frigider.

Etalarea secțiunilor pe lame albuminizate se va face, dacă este posibil, prin procedeul uscat (pag. 49) sau cu apă distilată, foarte ușor încălzită, după care uscarea secțiunilor se face la rece. Deparafinarea cu benzen este bine să fie urmată de colodinare (pag. 71).

Pentru piesele osoase fragile (urechea internă, cornete nazale etc.) este recomandată decalcificarea, practicată după includere în celoidină, completată la urmă cu includerea în parafină (pag. 67). Prezentăm în continuare metodele uzuale de decalcificare în histochimie:

a) Decalcificarea cu acizi organici. **Metoda Lorch** este indicată în special pentru fosfatazele alcaline: 1. fixare 12—24 ore în acetonă la rece (probe de 2—4 mm); 2. decalcificare 3—10 zile în amestecul: acid citric cristalizat 14,7 g; sol. 0,2 N de NaOH, 700 ml; sol. 0,1 N de HCl 300 ml; sol. apoasă 1% sulfat de zinc, 2 ml; cloroform 0,1 ml; 3. spălarea decalcificatorului în cîteva băi de apă dist.; 4. reactivarea fosfatazei alcaline timp de 6 ore, la 37°C în

Scanned with OKEN Scanner

amestecul Lillie: apă dist. 100 ml; veronal sodic 1 g; glicină (glicocol) 75 mg; 4. spălare 2—3 ore cu apă; 5. deshidratare cu alcool, clarificare în cloroform, includere în parafină.

Metoda Greep (pentru fosfatază alcalină): 1. fixare 24 ore cu alcool absolut la rece; 2. clătire cu alcool 50° și apoi cu apă dist.; 3. decalcificare cu sol. Greep: sol. 2% acid formic și sol. 20% citrat de sodiu în părți egale; durata decalcificării este de 2—10 zile, timp în care se va schimba soluția de cîteva ori; 4. spălare 10 min. cu apă curgătoare; 5. reactivarea fosfatazei ca pentru metoda Lorch; 6. deshidratare cu alcool, clarificare cu benzen, includere în parafină de 48—52°C.

Metoda Lillie cu tampon de acid citric și citrat de amoniu: 1. fixare cu formol sau acetonă la rece; 2. decalcificare la rece timp de 4—6 zile în soluția: sol. 7% acid citric monohidrat 5 ml; sol. 7,54% citrat de amoniu anhidru 950 ml; sol. 1% sulfat de zinc 2 ml; cloroform 0,1 ml; 3. spălare cu apă curgătoare; 4. reactivarea fosfatazei ca pentru metoda Lorch; 5. spălare 2—3 ore cu apă curgătoare; 6. deshidratare, clarificare și includere în parafină.

b) Decalcificarea cu agenți chelatori. Se utilizează mai ales sarea disodică a acidului etilendiamintetracetic (EDTA, Versen, Sequestren), rezultatele fiind bune atît pentru evidențierea unor enzime, cît și pentru alte substanțe (acizi nucleici, mucopolizaharide etc.). Acești agenți nu pot fi însă folosiți atunci cînd urmărim evidențierea unor metale (fier, plumb, cupru etc.). Se pot utiliza următoarele tehnici:

Metoda Freiman: 1. fixare cu alcool sau acetonă timp de 24 ore la rece; 2. spălare cu apă

Scanned with OKEN Scanner

curgătoare; 3. decalcificare 24 ore la rece cu o sol. apoasă 5% EDTA al cărei pH se aduce la 6—6,5 cu o sol. normală de NaOH; decalcificarea se continuă încă 12—15 zile la temp. laboratorului, schimbînd reactivul tot la 3 zile; 4. spălare cu apă curentă; 5. reactivarea fosfatazei ca pentru metoda Lorch; 6. deshidratare, clarificare și includere în parafină. **Variante:** Hillemann și Lee recomandă fixarea cu formol și decalcificarea cu sol. 5,5% EDTA în formol 10%. Cook și Cohn recomandă fixarea cu formol salin și decalcificarea cu sol. 5,5% EDTA în tampon fosfat pH 7,4, urmată de spălare cu alcool 70°, reactivare etc.

Metoda Balogh pentru fosfataza acidă: 1. probe nefixate se declacifică timp de 3—4 zile la rece cu sol. 10% EDTA în tampon fosfat 0,1 M cu pH 7,0; 2. sugativarea probelor cu hîrtie de filtru, secționarea la criotom (10—20 microni), culegerea secțiunilor pe lamele curate și uscare timp de 30 min. la temp. laboratorului; 3. fixare timp de 1 oră la rece cu formol Baker (pag. 23), spălare cu apă dist., după care se trec în mediul de incubare.

c) Decalcificarea cu rășini schimbătoare de ioni (Dowex 50; Amberlit IR-120; Zéocarb 225). Aceste rășini se utilizează mai puțin singure cît în asociație cu un decalcificator pe bază de acid formic sau citric, rostul rășinii fiind acela de a accelera decalcificarea. Practic, se depune într-un recipient un strat de rășină (1—2 p), iar deasupra lichidul decalcificator (8—9 p). După terminarea decalcificării, probele se spală și se includ în parafină ca în tehnicile precedente. Rășina se poate recupera

Scanned with OKEN Scanner

prin spălare de 2—3 ori cu HCl sol. 0,1 N și apoi de 3 ori cu apă distilată.

În cazul decalcificării cu substanțe chelatoare și cu rășini schimbătoare de ioni, nu este posibil controlul decalcificării prin metoda chimică.

Prin tehnicile de decalcificare prezentate s-a urmărit în primul rînd posibilitatea evidențierii unor activități enzimatice. Acest lucru este posibil pentru fosfataza alcalină, acidă și betaglucuronizadă. În schimb, activitatea fosforilazelor, oxidazelor și dehidrogenazelor este întotdeauna suprimată. Prin aceleași procedee de decalcificare se mai pot efectua în bune condiții reacția PAS (pag. 269), reacții pentru mucopolizaharide acide efectuate cu fier coloidal (pag. 287) sau cu albastru alcian (pag. 285), reacția metacromatică (pag. 292), reacții pentru aminoacizi ca tetrazoreacția Danielli (pag. 145) sau reactia Barrnett-Seligman cu DDD pentru gruparea -SH. (pag. 152). În preparatele făcute din probe decalcificate se observă întotdeauna o reducere a bazofiliei citoplasmatice și a tinctorialității nucleilor, fapt ce dovedește că are loc o pierdere apreciabilă de acizi nucleici. Glicogenul este de asemenea în mare parte hidrolizat. Acestę neajunsuri se pot simțitor atenua dacă se limitează durata decalcificării la strictul necesar. Dimpotrivă, în cazul cînd se cercetează activitatea fosfatazei alcaline prin tehnica cu glicerofosfat de sodiu, decalcificarea trebuie să fie totală, căci altfel reacția se va produce și la nivelul depozitelor restante de calciu. Putem preveni acest lucru dacă înainte de incubație tratăm secțiunile 10 minute cu un tampon citric cu pH 4,5—5,0 iar apoi le spălăm cel puțin 10 min. cu apă distilată.

Scanned with OKEN Scanner

E. INCLUDEREA

Nu vor fi descrise tehnicile uzuale de includere în histologie, ci doar unele adaptări ale acestora pentru scopuri histochimice. Efectul tuturor factorilor implicaţi în procesul de includere (solvenţi organici, temperatură, durată etc.) asupra diferiţilor constituenţi chimici tisulari trebuie bine cunoscut, căci altfel, ceea ce s-a păstrat corect prin fixare se poate pierde la includere.

a) METODĂ RAPIDĂ DE INCLUDERE ÎN PARAFINĂ (pentru fosfataza alcalină): 1. fixarea unor probe de dimensiuni mici în alcool 90°; 2. 2×30 min. alcool 96°; 3. 2×15 min. alcool absolut; 4. 2×30 min. benzen; 5. 3×20 min. parafină de 48—52°C; 6. deparafinarea secţiunilor cu xilol, acetonă anhidră, urmată de acetonă 40% şi apă distilată.

Varianta cu acetonă: 1. deshidratare 3×20 min. în acetonă anhidră; clarificare 2×15 min. cu benzen; 3. parafină 3×15 min., apoi ca mai sus, începînd de la punctul 6.

Varianta cu dioxan; 1. deshidratare 3×1 oră cu dioxan; 2. parafină 3×1 oră.

Varianta cu alcool n-butilic: 1. deshidratare 3×15 min. cu alcool 96° apoi la fel cu alcool absolut; 2. clarificare 2×1 oră cu alcool n-butilic; parafină 3×1 oră.

b) INCLUDEREA COMBINATĂ ÎN CELOIDINĂ-PARAFINĂ (E. Pearse): 1. deshidratare cu alcool; 2. tratare 3×1 oră cu alcool absolut-eter în părţi egale; 3. impregnare cu sol. 2% celoidină în alcool-eter timp de 16 ore; 4. se tamponează probele cu hîrtie de filtru apoi se trec pentru 2×1 oră în cloroform; 5. includere în parafină 3×30 min. Pentru activităţi enzimatice toţi timpii pînă la punctul 4 inclusiv se

Scanned with OKEN Scanner

efectuează la rece. Metoda se recomandă și pentru acele țesuturi care după includere simplă în parafină se secționează dificil.

Varianta Peterfi: 1. deshidratare cu alcool 96° și absolut 2×24 ore în fiecare; impregnare 3×24 ore cu sol 1% celoidină uscată în benzoat de metil; 3. clarificare cu benzen și includere în parafină.

Varianta Burket pentru decalcificare după includere: 1. se efectuează includerea obișnuită în celoidină pînă la baia cu celoidină 8%; 2. se întărește blocul cu cloroform și apoi se modelează pînă rămîne în jurul probei doar un strat subțire de celoidină; 3. se spală cloroformul în 2 băi de alcool izopropilic; 4. hidratare treptată cu alcool 80°, 50° și apă dist. cîte 24 ore în fiecare; 5. decalcificare urmată de spălare cu apă distilată, deshidratare cu alcool 96° și absolut, clarificare cu benzen fenicat (10 p benzen și 1 p fenol), apoi cu benzen pur și includere în parafină.

c) Includerea în dietilen glicoli („Esterwax") este indicată în special cînd se prelucrează țesuturi foarte dense, greu de secționat. Varianta Steedman se practică astfel: 1. deshidratare cu alcool, clarificare cu toluen sau etilen glicol; 2. impregnare timp de 3 ore în amestec de toulen și Esterwax 1 : 1, apoi 4×3 ore în Esterwax pur, la 66—70°C; 3. turnarea blocului se face obișnuit, doar că se va răci brusc, în frigider, la +4°C.

d) Includerea în polietilen glicoli („Carbowax") Aceste medii de montare se prezintă diferit, în funcție de greutatea lor moleculară: fluide la greutatea moleculară 200—500; vîscoase la gr. mol. 500—900 și consistente la gr. mol. 1000—10 000. Toate sînt hidrosolubile la temp. laboratorului, deci

Scanned with OKEN Scanner

includerea nu necesită deshidratare și clarificare cu solvenți organici. În consecință, metoda este indicată în histochimia lipidelor, glucidelor și chiar a enzimelor. Se procedează astfel: 1. fixare cu formol, urmată de spălare cu apă (pentru lipide 24—48 ore la temp. laboratorului, iar pentru enzime 16 ore la +4°C); 2. sol. 50% Carbowax-550 timp de 30 min. la temp. laboratorului; 3. sol. 75% Carbowax-550 timp de 30 min. la temp. laboratorului; 4. Carbowax-550 timp de 30 min. la 37°C; 5. sol. Carbowax-1000, timp de 30 min. la 37°C; 6. amestec de Nonex 63-B (polietilen-glicol-1000 monostearat) și Carbowax-1000 în părți egale, timp de 30 min., la 37°C; 7. Nonex pur, 20 min., la 37°C; pe tot parcursul includerii recipientele trebuie deseori agitate; 8. turnarea blocului se face cu Nonex pur, iar solidificarea la +4°C. Pentru etalarea și lipirea secțiunilor vezi pag. 70. După secționare suprafața liberă a blocului se acoperă cu un strat de Carbowax, iar blocul se păstrează într-un loc rece și uscat.

Varianta Pearse utilizează numai Carbowax-1000 în diferite concentrații: 1. fixare, spălare ca mai sus; 2. sol. 70% Carbowax-1000 timp de 30 min.; 3. sol. 90% Carbowax-1000 timp de 45 min.; 4. Carbowax-1000 nediluat, timp de 60 min., cu care apoi se face și turnarea blocului. Întreg procesul se face la temp. laboratorului, iar tăierea blocului la +4°C.

Observații: prepararea soluțiilor de Carbowax-550 se face astfel: se încălzește sol. concentrată pînă la emiterea de vapori, după care se adaugă apă dist. cu temp. de 50°C în proporțiile necesare.

Scanned with OKEN Scanner

e) Includerea în gelatină (E. Pearse) pentru histoenzimologie: 1. fizare 10—16 ore cu formol la +4°C; 2. spălare cu apă curentă 30 min.; 3. includere o oră la 37°C în soluția: gelatină pulvis 15 g, glicerină 15 ml; apă dist. 70 ml și un cristal de thymol; 4. turnarea blocului și răcire rapidă urmată de modelare, în așa fel încît în jurul probei să rămînă un strat mai gros de gelatină (5—6 mm); întărirea definitivă a blocului se face cu formol conc. la +4°C. Înainte de secționare blocurile se spală cu apă curgătoare. Secționarea se face la microtomul cu congelare. Pentru etalarea și lipirea secțiunilor vezi pag. 70.

F. SECȚIONAREA, ETALAREA ȘI MONTAREA

Pentru probele incluse în parafină sau celoidină aceste operații se fac în modul cunoscut din tehnica histologică.

Etalarea. Tratamentul secțiunilor obținute la microtomul cu congelare, criotom sau după congelare-deshidratare și congelare-substituție a fost prezentat în capitolele respective. Reamintim că numeroase substanțe (proteine, glicogen, substanțe minerale etc.) păstrate printr-un pretratament adecvat al probelor pot fi parțial sau total îndepărtate în momentul etalării secțiunilor. Alegerea modului de etalare (uscat, cu apă dist., cu alcool, la cald sau la rece etc.) se va face în funcție de solubilitatea și termolabilitatea substanțelor cercetate.

Etalarea secțiunilor din probe incluse în Esterwax se face ca pentru secțiunile la parafină, cu deose-

Scanned with OKEN Scanner

birea că, fără a scurge apa, preparatele se lasă să se usuce pe un plan orizontal, în etuvă la 37—40°C.

Secţiunile din probe incluse în Carbowax se etalează, după caz, cu sau fără fixare concomitentă, cu următoarele soluţii: a) dietilen glicol 40 p; apă dist. 50 p; formol conc. 10 p; b) gelatină 10 g se dizolvă în 60 ml apă dist. la 35°C şi se adaugă 50 ml glicerină; se filtrează şi la urmă se adaugă 1 g fenol.

Secţiunile din probe incluse în gelatină se depun pe lame date cu albumină-glicerină şi se lasă să se usuce complet la temp. laboratorului sau în etuvă la 37°C. Se acoperă apoi secţiunile cu hîrtie de filtru, se presează şi se picură în dreptul secţiunii formol 10% (pentru lipide) sau alcool absolut, se presează din nou cu ajutorul unei lame apoi se picură la fel apă dist., după care hîrtia de filtru se îndepărtează cu atenţie.

Soluţia pentru **lipirea secţiunilor** (albumină, glicerină, albumină-glicerină, amidon, plasmă sangvină, gelatină etc.) trebuie aleasă în funcţie de reacţia histochimică ce urmează să se efectueze. Sînt situaţii cînd lipirea cu aceste substanţe este contraindicată (reacţii pentru aminoacizi, proteine, reacţia cu iod pentru glicogen etc.) şi cînd etalarea se va face pe lame curate, prin procedeul uscat sau cu alcool de 70°. În aceste cazuri mai ales, dar şi atunci cînd reacţiile prevăd incubări sau spălări îndelungate, tratament la cald etc., există pericolul de dezlipire a secţiunilor. Acest accident se poate preveni atunci cînd nu există o contraindicaţie, prin **colodinare.** Aceasta se practică astfel: după deparafinarea şi deshidratarea secţiunilor, acestea se trec pentru 1—2 min. în sol.: alcool absolut 24,5 ml; eter sulfuric 24,5 ml; colodiu 5% 1 ml; de aici secţiunile se scot încet, se scurge excesul de colodiu

Scanned with OKEN Scanner

și se menţin la aer 15—30 sec.; întărirea peliculei protectoare de colodiu se face în cîteva minute cu alcool 80° sau cu alcool-formol. Pentru secţiunile făcute la microtomul cu congelare sau criotom se procedează astfel: secţiunea depusă pe lamă se acoperă cu hîrtie de filtru, se presează uşor şi apoi se picură din abundenţă, peste hîrtia de filtru alcool etilic absolut; după cîteva minute se îndepărtează hîrtia, iar secţiunea va putea fi colodinată ca mai sus.

Montarea. medii de montare anhidre. Pentru numeroase reacţii histochimice este posibilă montarea obişnuită în medii anhidre ca balsamul de Canada, răşina Dammar sau medii sintetice. Un mediu sintetic cu bune proprietăţi optice este cel propus de Kirkpatrik si Lendrum sub denumirea de DPX: 10 g distiren 80; 5 ml dibutilftalat; 35 ml xilol. Indice de refracţie: 1,52. Este contraindicat în toate tehnicile bazate pe reducerea unei sări de argint sau în cele bazate pe formarea sulfurii de cobalt (fosfataza alcalină şi acidă, colinesteraza). Mediile sintetice comerciale (Caedax, Depex, HSR, Lustrex ş.a.) prezintă avantajul unei neutralităţi chimice, deci o mai bună conservare a preparatelor. Mediul „Euparal“ (indice de refracţie 1,48) este alcoolosolubil, deci montarea se poate face după o scurtă tratare a secţiunilor cu alcool 80°.

Pentru microscopia cu fluorescenţă se indică medii nefluorescente ca „Univert“ (produs „Serva“ sau altele similare).

Medii apoase. Foarte adesea tratarea secţiunilor cu solvenţi organici este total contraindicată (lipide, enzime etc.), fapt ce impune montarea în diferite medii apoase.

Scanned with OKEN Scanner

a) **Glicerogelul** (indice de refracţie 1,47): se dizolvă 0,2 g alaun de crom în 30 ml apă dist. iar separat 3 g gelatină în 50 ml apă dist.; după amestecarea acestor două soluţii se adaugă 20 ml glicerină şi se corectează reacţia la pH 7,4 cu sol. de carbonat de sodiu.

b) **Glicerină-gelatină** (indice de refracţie 1,47): se dizolvă 15 g gelatină p.a. în 100 ml apă dist. caldă; se adaugă 100 ml glicerină şi se încălzeşte totul pe baia marină, se filtrează prin vată de sticlă şi se adaugă drept conservant o picătură de fenol.

Mediile pe bază de glicerină şi gelatină se fluidifică la întrebuinţare prin încălzire în baie marină. Montarea se face mai bine dacă secţiunea este sugativată cu hîrtie de filtru iar lama şi lamela uşor încălzite. După aşezarea lamelei se lasă preparatul pe un suport rece.

c) **Siropul Apathy** (indice de refracţie 1,52): se dizolvă la cald (aprox. 50°C) prin agitare 50 g gumă arabică şi 50 g zahăr cristale în 50 ml apă dist.; purificarea este posibilă doar prin centrifugare şi decantare; drept conservant se adaugă 50 mg thymol. Întărirea mediului se face la 37°C în 24—48 ore.

d) **Siropul Lillie** (indice de refracţie 1,47): se lasă să se dizolve în etuvă la 60°C, 75 g levuloză în 25 ml apă dist. apoi se adaugă un cristal de thymol.

e) **Mediul Burstone** (PVP): se lasă să se dizolve treptat, în aprox. 24 ore, 50 g polivinilpirolidon în 50 ml apă dist., după dizolvare se adaugă 2 ml glicerină şi un cristal thymol. Indice de refracţie 1,43.

Observaţii: mediile apoase au tendinţa să se cristalizeze prin evaporarea apei, fapt ce face preparatele inutilizabile. Se poate preveni acest lucru prin obturarea circumferinţei lamelei cu un cadru de

Scanned with OKEN Scanner

nitrolac (lac incolor) depus cu ajutorul unui penel subțire.

Reamintim că numeroase preparate histochimice nu se conservă timp îndelungat, fie din cauza transformării sau decolorării produsului de reacție, fie chiar din cauza mediului de montare, fapt ce ne obligă să le examinăm și fotografiem fără întîrziere. În toate cazurile preparatele vor fi ferite de lumina directă.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL III

EVIDENȚIEREA HISTOCHIMICĂ A SUBSTANȚELOR MINERALE

Cu toate că în chimia analitică metodele de identificare a substanțelor minerale sînt deosebit de exacte, în histochimie acest capitol constituie încă o problemă dificilă din cauza greutăților în imobilizarea acestor substanțe. Totuși, dată fiind importanța lor în histofiziologie, histopatologie, toxicologie, medicină judiciară etc. prezentăm în acest capitol, tehnicile uzuale aplicate în prezent pentru identificarea substanțelor minerale.

ALUMINIU

Metoda Irvin. **Principiu:** formarea unui lac roșu în contact cu acidul aurin-tricarboxilic (Aluminon). **Reactivi:** 1. sol. tampon: clorură de amoniu 5 M (267,5 g/l), 60 ml; acetat de amoniu 5 M (385,3 g/l), 60 ml; acid clorhidric 6 M (500 ml/l de CH conc.), 10 ml; soluția trebuie să aibă pH 5,2. 2. sol. de aurin: se dizolvă 2 g din sarea de sodiu sau amoniu a acidului aurintricarboxilic în cîțiva ml sol. tampon, după care se completează cu aceeași soluție la vol. de 100 ml; se încălzește la 75°C pentru 15 min. apoi se filtrează la cald. 3. diferențiator: sol. tampon (1) 36 ml: sol. apoasă de carbonat de amo-

Scanned with OKEN Scanner

niu 1,6 M, 100 ml; sol. are pH 7,2. **Tehnica:** 1. fixare cu formol sau alcool, secţionare la congelare sau includere la parafină: deparafinare, hidratare; 2. colorare cu sol. 2 timp de 5 min. la 75°C sau 15 min. la 60°C; 3. clătire cîteva sec. cu apă dist. rece; 4. diferenţiere în sol. 3 timp de 3—5 sec.; 5. clătire scurtă cu apă dist.; 6. colorarea rapidă de fond cu o sol. apoasă saturată de acid picric sau sol. 0,01% albastru de metilen; 7. deshidratare cu alcool, clarificare cu xilol, montare în balsam de Canada sau medii sintetice. **Rezultat:** hidroxidul de aluminiu se colorează în roşu, citoplasma în galben, nucleii în albastru.

Metoda cu solocron cyanină r.s. **Principiu:** colorantul formează cu sărurile de aluminiu un produs de chelare colorat. **Reactivi:** 1. sol. apoasă 1% ClH 100 ml; Solocron Cyanină RS 0,2 g; 2. alcool etilic absolut 100 ml; acid clorhidric conc. 1 ml. **Tehnica:** 1. fixare în formol, includere în parafină sau secţionare prin congelare; 2. secţiuni hidratate se colorează 15 min. în sol. 1; 2. clătire cu apă caldă pînă cînd secţiunile devin din galbene, albastre-cenuşii deschis; 3. clătire cu sol. 2; 4. alcool absolut, xilol, montare în balsam de Canada sau medii sintetice. **Rezultat:** sărurile de aluminiu se colorează în roşu sau roz în funcţie de abundenţa lor.

ARGINT

Identificarea depozitelor intratisulare (brune sau negre) de argint prezintă importanţă doar în studiul argirozelor spontane sau experimentale. Se impune şi problema deosebirii acestora de pigmentul melanic.

Scanned with OKEN Scanner

Metoda Okamoto cu acid rubeanhidric (varianta Gedigk-Pioch). **Principiu:** sărurile de argint formează cu ac. rubeanhidric (dithioxamidă) un compus insolubil de culoare brună. **Reactivi** 1. apă de clor; 2. apă dist. 94 ml; sol. 1% amoniac 3 ml; sol. 0,1% ac. rubeanhidric în alcool absolut 3 ml. **Tehnica:** 1. fixare cu formol, includere în parafină; 2. secţiuni hidratate se tratează 10—20 min. cu apă de clor; 3. spălare cu apă dist.; 4. tratare 2—5 ore cu sol. 2; 5. deshidratare cu alcool, clarificare cu xilol, montare în balsam sau medii sintetice; se poate practica o colorare de fond cu hemalaun. **Rezultat:** sărurile de argint se colorează în brun intens.

Metoda Okamoto cu p-dimetilaminobenziliden-rodanină. **Principiu:** reactivul formează cu argintul un produs de chelare. **Reactivi:** 1. alcool etilic 10° 100 ml; acid azotic conc. (d = 1,38) 0,1 ml; p-dimetilaminobenziliden-rodanină 0,2 g; 2. col. saturată de p-dimetilaminobenziliden-rodanină în alcool absolut 3,5 ml; acid azotic conc. 3 ml; apă dist. ad 100 ml. **Tehnica:** fixare cu formol, includere în parafină sau secţionare la congelare (probe proaspete secţionate la criotom).

a) Secţiuni la criotom sau congelare: 1. tratare cu sol. 1, la 37°C timp de 1—3 ore; 2. spălare cu alcool 70°; 3. spălare cu apă distilată; 4. montare în glicerogel.

b) Secţiuni la parafină: 1. xilol, alcool 96°, alcool 70°; 2. tratare cu sol. 2 la 37°C timp de 24 ore; 3. deshidratare cu alcool, clarificare cu xilol, montare în balsam sau medii sintetice. În ambele cazuri se poate face o contracolorare cu hemalaun.

Scanned with OKEN Scanner

Rezultat: sărurile de argint se colorează în roşu-violet.

ARSENIC

Evidenţierea sărurilor de arsenic prezintă importanţă mai ales pentru examenul histopatologic şi medico-legal.

METODA CASTEL CU SULFAT DE CUPRU. **Principiu:** formarea de arsenit de cupru, de culoare verde, în prezenţa sulfatului de cupru. **Reactivi:** 1. sol. formol 10% conţinînd 2,5% sulfat de cupru. **Tehnica:** probe subţiri se fixează 5 zile în sol. 1; 2. spălare 24 ore cu apă curentă; 3. includere în parafină; 4. pe secţiunile deparafinate şi hidratate se practică o coloraţie nucleară (safranină sau Kernechtrot); 4. deshidratare cu alcool, clarificare cu xilol, montare în balsam. **Rezultat:** arsenitul de cupru se colorează în verde.

AUR

Prezenţa aurului în ţesuturi poate apare după introducerea experimentală sau terapeutică.

METODA CHRISTELLER CU CLORURĂ STANOASĂ. **Principiu:** clorura stanoasă, în mediu acid reduce compuşii organici ai aurului care formează un precipitat brun sau purpuriu. **Reactivi:** 1. sol. apoasă 5% clorură stanoasă, proaspăt preparată, 40 ml; acid clorhidric conc. (d = 1,19) 5 ml. **Tehnica:** 1. fixare cu formol sau alcool, includere în parafină; 2. secţiuni deparafinate şi hidratate se tratează cu sol. 1 timp de 36 ore la 56°C sau 10 min. în soluţia adusă la fierbere; 3. spălare cu apă distilată; 4. colora-

Scanned with OKEN Scanner

rea nucleară cu Kernechtrot; 5. deshidratare cu alcool, clarificare cu xilol, montare în balsam. **Rezultat:** compușii anorganici ai aurului se colorează în brun închis sau purpuriu.

BARIU ȘI STRONȚIU

Fosfații și carbonații de bariu și stronțiu se află în general alături de fosfații și carbonații de calciu, fapt ce implică reacții complementare pentru distingerea lor.

METODA WATERHOUSE CU RODIZONAT DE SODIU. **Principiu:** reactivul formează cu sărurile de bariu un compus de chelare de culoare neagră, care prin tratament cu ClH virează în roșu. **Reactivi:** 1. sol. apoasă 0,2% rodizonat de sodiu proaspăt preparată; 2. sol. apoasă 20% ClH. **Tehnica:** 1. fixare cu formol sau alcool-formol, secționare prin congelare sau includere în parafină; 2. secțiuni deparafinate și hidratate se tratează cu sol. 1 la 60°C iar secțiunile prin congelare la 37°C timp de 1—2 ore; 3. clătire cu alcool 50° și apoi cu apă dist.; 4. tratare 5 min. cu sol. 2; 5. spălare cu apă dist.; 6. deshidratare cu alcool, clarificare cu xilol, montare în balsam sau medii sintetice. **Rezultat:** sărurile de bariu se colorează în roșu. **Observații:** dacă se suprimă punctul 4 din tehnică, reacția evidențiază, printr-un produs negru, atît sărurile de bariu, cît și cele de stronțiu.

BERILIU

Acest metal poate ajunge în țesuturi mai ales în mod experimental. Reacțiile existente nu sînt strict

Scanned with OKEN Scanner

specifice şi necesită operaţii complementare pentru diferenţierea compuşilor beriliului de cei ai calciului şi aluminiului.

Metoda cu azurin-solocrom. **Principiu:** colorantul formează cu sărurile de beriliu un compus colorat în albastru-negru, iar acesta, sub acţiunea unui acid diluat, virează în brun-oranj. **Reactivi:** 1. azurin solocrom 0,2 g; sol. apoasă 2% hidroxid de sodiu 100 ml; 2. sol. apoasă 20% acid clorhidric conc. **Tehnica:** 1. fixare cu formol 10%, includere în parafină; 2. secţiuni deparafinate şi hidratate se tratează cu sol. 1 timp de 30 min.; 3. clătire cu apă dist.; 4. tratare cu sol. 2 timp de 5 min.; 5. clătire cu apă dist.; 6. deshidratare cu alcool, clarificare cu xilol, montare în balsam. **Rezultat:** sărurile de beriliu apar în brun-oranj. **Observaţii:** dacă se exclude punctul 4 din tehnică, sărurile de beriliu sînt evidenţiate împreună cu cele de calciu printr-un produs colorat în negru. Sărurile de aluminiu sînt dinainte dizolvate datorită alcalinităţii sol. 1.

Metoda cu verde naftocrom B în mediu acid. **Principiu:** cu acest reactiv anumiţi compuşi ai beriliului formează un lac verde-gălbui. **Reactivi:** 1. sol. 0,1% verde naftocrom B în tampon fosfat 0,1 M cu pH 5,0 (1 ml sol. M/10 fosfat disodic şi 49 ml sol. M/10 fosfat monopotasic); 2. sol. apoasă 0,1—0,2% verde naftocrom B. **Tehnica:** 1. fixare cu formol sau alcool-formol, secţionare prin congelare sau includere în parafină; 2. secţiuni deparafinate şi hidratate se tratează cu sol. 1 la 37°C, timp de 30 min.; 3. spălare cu apă dist. şi sugativare cu hîrtie de filtru; 4. diferenţiere cu alcool absolut 15—30 min.; 5. spălare cu apă dist.; 6. colorare nucleară cu Kernechtrot; 7. deshidratare cu alcool, clarificare cu xilol, montare în balsam. **Rezultat:**

Scanned with OKEN Scanner

hidroxidul de beriliu, precum și complexele sărurilor de beriliu cu proteine se colorează în verde deschis. **Observații:** dacă în paralel se face colorarea unor secțiuni cu sol. apoasă 0,1—0,2% verde naftocrom B timp de 5—10 min. la temp. laboratorului, urmată de spălare cu apă dist., deshidratare, clarificare și montare în balsam, se evidențiază sărurile de calciu în brun-roșcat, iar cele de aluminiu în verde închis.

BISMUT

Detectarea în țesuturi a compușilor bismutului poate prezenta interes din cauza utilizării sale în terapeutică sau în scopuri experimentale.

METODA CU IODURĂ DE POTASIU-SULFAT DE CHININĂ (BRUCINĂ) după Wachstein și Zak. **Principiu:** sărurile de bismut, după decolorare cu apă oxigenată, formează cu reactivul, în mediu sulfuric, un precipitat de iodobismutat de chinină, de culoare roșie. **Reactivi:** 1. reactivul Castel (modificat): 100 ml apă dist., 0,25 g sulfat de chinină (brucină); 3 picături de ac. sulfuric conc.; după dizolvare se adaugă 2 g iodat de potasiu; se păstrează în sticlă brună, iar la folosire se filtrează; 2. reactivul Castel diluat: se dizolvă sol. 1 cu apă dist. în proporție 1 : 3; 3. sol. de levuloză: se lasă să se dizolve, la 37°C timp de 24 ore, 30 g levuloză în 20 ml apă dist. după care se adaugă o picătură de sol. 2; 4. colorant de fond: 100 ml sol. 2; 1 ml sol. apoasă 1% verde lumină; 5. apă oxigenată 30%. **Tehnica:** 1. fixare cu formol 10%, secționare prin congelare sau includere în parafină; 2. secțiunile deparafinate și hidratate se tratează 10—15 sec. cu sol. 5; 3. spălare cu apă curentă; 4. tratare cu sol. 1

Scanned with OKEN Scanner

timp de o oră; 4. spălare cu sol. 2, agitînd preparatul pentru a se elimina precipitatul; 5. colorare de fond 5 min. cu sol. 4; 6. montare direct în siropul de levuloză. **Rezultat:** sărurile de bismut apar în roșu-oranj, iar fondul verde deschis. **Atenţiune:** brucina este un produs foarte toxic!

CALCIU

În organismul metazoarelor calciul există sub trei forme: a) forma ionică solubilă, greu de precipitat „in situ"; b) forma ionică insolubilă, precipitabilă și deci evidenţiabilă prin reacţii histochimice; c) forma mascată, decelabilă doar prin autohistoradiografie sau alte metode fizice. Țesuturile cele mai calcificate, adică oasele și dinţii, nu se pretează la examen histochimic decît prin procedeul de secţionare fără decalcificare, realizabil doar cu microtoame speciale. În studiul ţesuturilor moi este absolut contraindicată utilizarea fixatorilor acizi sau a celor pe bază de metale grele.

Metoda cu ftalocianine. **Principiu:** ftalocianinele cuprice solubile în apă (albastru alcian 8 GS sau Durazol Fast Blue 8 G) sau în alcool (Luxol Fast Blue MBS sau Methanol Fast Blue 2 G) colorează depozitele de calciu în albastru. **Reactivi:** 1. sol. apoasă 1% de ClH; 2. sol. apoasă 0,1% de albastru alcian sau Durazol Fast Blue (sau aceeași concentraţie în alcool 95° din ftalocianinele alcoolosolubile); 3. sol. apoasă 0,05% carbonat de litiu. **Tehnica:** 1. fixare cu formol sau alcool, includere în parafină; 2. secţiuni deparafinate și hidratate se colorează 30—60 min. cu sol. 2; 3. spălare cu apă 1 min.; 4. diferenţiere cu sol. 3 pînă cînd secţiunile devin albastre-deschis; 5. deshidratare cu alcool, cla-

Scanned with OKEN Scanner

rificare cu xilol, montare în medii sintetice. Secţiunile de control se tratează timp de 20 min. cu sol. 1 apoi se colorează ca mai sus. **Rezultat:** depozitele de calciu se colorează în albastru numai în secţiunile netratate cu HCl. **Observaţii:** ftalocianinele cuprice alcoolosolubile colorează depozitele de calciu mult mai rapid.

Metoda cu eriochrome black t pentru ţesuturi de nevertebrate. **Reactivi:** sol. apoasă 4,5% Erichrome Black T tamponată la pH 9,5 cu sol. N de NaOH. **Tehnica:** 1. fixare şi includere ca la tehnicile precedente; 2. secţiuni deparafinate şi hidratate se colorează 3—5 min. cu sol. 1; 3. spălare cu apă dist.; 4. montare în mediu apos (glicerogel). **Rezultat:** depozitele de calciu se colorează în roşu deschis, iar ţesuturile în albastru.

Metoda von kosa. **Principiu:** este o metodă indirectă sau de substituţie în care într-o primă fază are loc substituirea calciului, cu formarea de fosfaţi şi carbonaţi de argint, iar în a doua fază se „developează" sărurile de argint cu formare de argint metalic. **Reactivi:** 1. sol. apoasă 2—5% de azotat de argint; 2. sol. apoasă 0,5% de hidrochinonă; 3. sol. apoasă 5% de tiosulfat de sodiu; 4. sol. apoasă 1% de roşu neutru. **Tehnica:** 1. fixare cu formol, includere în parafină; 2. secţiuni deparafinate şi hidratate se tratează 5—30 min. cu sol. 1 la întuneric; 3. clătire repetată cu apă dist.; 4. tratare, la lumină, cu sol. 2 timp de 2 min.; 5. clătire cu apă dist.; 6. tratare 30—60 sec. cu sol. 3; 7. spălare cu apă dist.; colorare nucleară cu sol. 4 timp de 30 sec.; 8. deshidratare cu alcool, clarificare cu xilol, montare în balsam sau DPX. **Rezultat:** zonele în care a existat calciu sînt acoperite cu un precipitat negru de argint metalic.

Scanned with OKEN Scanner

Varianta Gömöri pentru țesut osos sau dentar: 1. fixare cu alcool 96° (proba de 2 mm); 2. spălare 3—5 ore cu apă dist.; 3. tratare la întuneric, 6—10 zile cu sol. apoasă 1,5% azotat de argint, reîmprospătată de 1—2 ori; 4. spălare, la întuneric, cu apă dist. schimbată mereu, pînă cînd nu mai formează precipitat la adăugarea de ClNa; 5. reducere, la întuneric, timp de 4—6 zile, cu sol. apoasă 5% tiosulfat de sodiu la care se adaugă 5 picături de sol. N/10 NaOH pentru fiecare 5 ml de soluție; 6. spălare, la întuneric, cu apă curentă, 3—4 ore; 7. fixare, la întuneric, cu sol. 5% tiosulfat de sodiu timp de 2 zile; 8. spălare, la întuneric, cu apă curentă 2—4 ore; 9. decalcificare, la întuneric, timp de 1—3 zile, cu sol. apoasă 8% acid sulfosalicilic; 10. includere în parafină, secționare, deparafinare, montare în balsam. **Rezultat:** ca în metoda precedentă.

Reacția Johnston cu fericianură ferică. **Principiu:** este o metodă indirectă de substituție în care în primul timp ferocianura de potasiu dintr-un tampon de acetat de amoniu dă naștere la ferocianură de amoniu și de calciu insolubilă. Aceasta este transformată apoi de clorura ferică în ferocianură ferică (albastru de Prusia). **Reactivi:** 1. alcool etilic 40° 100 ml; acetat de amoniu 10 g; acid acetic glacial, cu picătura, pînă la pH 5; ferocianură de potasiu 1 g. Se poate utiliza după 2 ore de la preparare și se conservă aproximativ 8 ore; 2. alcool etilic 30° 100 ml; acetat de amoniu 10 g; acid acetic glacial, cu picătura pînă la pH 5; 3. sol. apoasă 10% de clorură ferică. **Tehnica:** 1. fixare cu formol sau cu alcool, includere în parafină; 2. secțiuni deparafinate se conduc pînă în alcool 70°; 3. tratare cu sol. 1 timp de 30—60 sec.; 4. clătire în 2—3 băi

Scanned with OKEN Scanner

cu sol. 2; 5. tratare 5 min. cu sol. 3; 6. deshidratare cu alcool, clarificare cu xilol, montare în balsam. **Rezultat:** ionii de calciu se colorează în albastru.

METODA PIZZOLATO PENTRU OXALATUL DE CALCIU. **Principiu:** reacţie indirectă de substituire a calciului cu argint, urmată de o transformare a oxalatului în carbonat prin oxidare cu apă oxigenată. **Reactivi:** 1. apă oxigenată 30% 10 ml; sol. apoasă 5% azotat de argint 10 ml; sol. are pH 6; 2. sol. apoasă 2% safranină. **Tehnica:** 1. fixare cu formol neutru, includere în parafină; 2. secţiuni deparafinate şi hidratate se tratează, pe stativ, cu sol. 1 timp de 15—30 min. la lumina unui bec de 25 W aşezat la distanţa de 15 cm; dacă se degajă bule de aer se schimbă reactivul; 3. spălare cu apă, repetată de 3—4 ori; 4. colorare 3 min. cu sol. 2; 5. deshidratare cu alcool, clarificare cu xilol, montare în balsam. **Variante:** Pearse recomandă o concentraţie a azotatului de argint de numai 2% şi efectuarea reacţiei la 22°C, fără iluminare. **Rezultat:** cristalele de oxalat de calciu se colorează în negru intens, iar fondul în roşu.

METODA YASUI PENTRU OXALATUL DE CALCIU. **Reactivi:** 1. sol. apoasă 5% azotat de argint; 2. sol. saturată de acid rubeanic în alcool 70°, adăugînd 1 picătură de amoniac la 100 ml soluţie; 3. sol. 2% verde de metil. **Tehnica:** 1. fixare cu formol, includere în parafină; 2. secţiuni deparafinate şi hidratate se tratează 10—20 min. cu sol. 1; 3. spălare repetată cu apă dist.; 4. tratare 1 min cu sol. 2; 4. clătire cu alcool 50°; 5. colorare cu sol. 3 timp de 2 min; 6. deshidratare rapidă cu alcool, clarificare cu xilol, montare în mediu sintetic. **Rezultat:** depozitele de oxalat de calciu apar în negru, iar nucleii în verde.

Scanned with OKEN Scanner

CLORURI

Evidenţierea ionilor de Cl^- prezintă un deosebit interes practic şi teoretic, dar marea lor difusibilitate impune precauţii tehnice deosebite.

Metoda Gersh. **Principiu:** clorurile din ţesuturi sînt precipitate sub formă de clorură de argint, după care se face reducerea sării de argint sub formă de argint metalic. **Reactivi:** 1. sol. apoasă 60% azotat de argint la care se adaugă cîteva picături de acid fosforic. **Tehnica:** 1. probe foarte mici se tratează prin congelare-deshidratare şi apoi se includ în parafină. 2. etalare uscată pe lame nealbuminizate; 3. deparafinare cu eter de petrol care se elimină la urmă prin evaporare; 4. tratare cîteva secunde cu sol. 1; 5. se varsă reactivul şi se acoperă secţiunea cu puţină glicerină; 6. se expune preparatul, cu secţiunea în jos, la o lumină foarte puternică; 7. se examinează, ca atare, imediat. **Rezultat:** clorurile apar sub forma unui precipitat cristalin de culoare galben-brună.

COBALT

Metoda cu sulfură de amoniu. **Principiu:** în contact cu acest reactiv sărurile de cobalt se transformă în sulfură neagră de cobalt. **Reactivi:** 1. sulfură de amoniu 5—10 picături; apă distilată 50 ml; se prepară extemporan. **Tehnica:** 1. fixare cu formol, includere în parafină; 2. secţiuni hidratate se tratează 2 min. cu sol. 1; 3. spălare 5 min. cu apă curentă; 4. colorare nucleară cu Kernechtrot; 5. deshidratare, clarificare, montare în balsam. **Rezultat:** sărurile de cobalt se colorează în negru. **Observaţii:** acest metal se află în organismul mamiferelor în

Scanned with OKEN Scanner

cantităţi atît de mici, încît evidenţierea histochimică priveşte doar administrările experimentale de compuşi ai cobaltului. În aceste cazuri se vor practica şi preparate de control de la animal martor.

CUPRU

Reacţiile pentru evidenţierea cuprului vor fi precedate de demascarea acestuia prin procedeul Uzman: secţiunile deparafinate şi hidratate se depun, cu faţa în jos, deasupra unui recipient conţinînd acid clorhidric concentrat, acoperindu-se totul cu un capac; se lasă astfel 15 min. după care se spală 15 min. cu alcool absolut.

Metoda Okamoto-Utamura cu acid rubeanic. **Principiu:** reactivul formează cu sărurile de cupru sau complexele acestuia cu proteinele un compus verde-negricios. **Reactivi:** 1. sol. 0,1% acid rubeanic (ditioxamidă) în alcool 70°. **Tehnica:** 1. fixare cu formol, includere în parafină; 2. secţiuni deparafinate şi hidratate sînt tratate pentru demascarea cuprului, ca mai sus; 3. spălare cu alcool absolut 15 min.; 4. tratare cu sol. 1 timp de 10 min. după care se adaugă la sol. de acid rubeanic 200 mg acetat de sodiu (pentru 100 ml soluţie), se agită şi se lasă astfel 24—48 ore; 5. se trec preparatele în alcool 70° agitîndu-le la început, apoi lăsîndu-le timp de 60—90 min.; 6. alcool absolut 24 ore; 7. xilol, montare în balsam. **Rezultat:** sărurile de cupru se colorează în verde spre negru. **Observaţii:** pentru frotiuri de sînge sau hemomedulă McNary recomandă: frotiurile umede se acoperă cu sol. de acid rubeanic şi amoniac concentrat în părţi egale; se acoperă cu lamelă şi se examinează imediat.

Scanned with OKEN Scanner

Metoda waterhouse cu dietildithiocarbamat de sodiu. **Principiu:** reactivul formează cu cuprul un produs de chelare de culoare galbenă-brună. **Reactivi:** 1. sol. apoasă 0,1—0,)2% dietildithiocarbamat de sodiu la care se mai adaugă HCl în proporţie de 2%. **Tehnica:** 1. secţiuni prin congelare sau la criostat din ţesuturi proaspete sau fixate cu formol sau formol-alcool; 2. tratare cu sol. 1 timp de 1—3 ore; 3. secţiunile din probe nefixate se spală cu apă distilată apoi se fixează cu formol 10%, din nou spălare şi montare în mediu apos; secţiunile din probe fixate se spală cu apă distilată şi se montează la fel. **Rezultat:** sărurile de cupru apar în galben-brun.

Metoda cu benzidină. **Principiu:** reactivul formează cu cuprul depozite de albastru de benzidină care, prin oxidare, devin cafenii. **Reactivi:** 1. diclorhidrat de benzidină 10 ml; thiocianat de amoniu 30 mg; apă dist. 5 ml; 2. sol. apoasă 1% roşu neutru. **Tehnica:** 1. fixare cu formol, includere în parafină; 2. secţiuni hidratate se tratează cu sol. 1 timp de 5—10 min.; 3. clătire cu apă dist.; 4. colorare 15 sec. cu sol. 2; 4. clătire cu apă dist.; deshidratare, clarificare, montare în balsam. **Rezultat:** sărurile de cupru (Cu^{++}) se colorează în albastru ce virează în cafeniu. **Observaţii:** metoda dă rezultate pe ţesuturile mamiferelor doar după administrările experimentale de Cu.

Tot pentru cupru vezi tehnica cu p-dimetilaminobenzilidenrodanin (pag. 77).

FIER

Cercetarea histochimică a fierului, element cu o deosebită importanţă biologică, prezintă un interes

Scanned with OKEN Scanner

de prim ordin, atît pentru histolog, cît și pentru histopatolog. În țesuturile animale fierul se află sub două forme: fierul ionic, ușor decelabil prin metode foarte specifice și sensibile și fierul mascat, evidențiabil prin metode chimice doar după practicarea unui procedeu de demascare. Fixarea recomandată pentru toate tehnicile este cea cu formol. M. Gabe preferă amestecul Bouin din cauza mai bunei fixări histologice. Sînt contraindicați toți fixatorii pe bază de metale grele: sublimat, bicromat de potasiu, acid cromic etc. Pentru reacții se vor utiliza numai substanțe chimic pure (p.a.) deoarece, dacă au chiar urme de fier, acestea sînt reținute de o serie de structuri puternic siderofile (nuclei, granule de secreție, structuri bogate în mucopolizaharide acide) și astfel se produc erori prin exces. Din același motiv, secțiunile nu se vor manipula cu instrumente metalice. În numeroase tehnici se recurge la soluții cu ferocianură de potasiu. Acestea se prepară în momentul folosirii, numai cu apă distilată și trebuie să fie galbene-clare. Soluțiile cu o cît de ușoară tentă verzuie nu pot fi utilizate.

METODA PERLS CU ALBASTRU DE PRUSIA, VARIANTA LISON. **Principiu:** în mediu acid ionii ferici (Fe^{+++}) reacționează cu ferocianura de potasiu formînd un precipitat albastru de ferocianură ferică (albastrul de Prusia). **Reactivi:** 1. se prepară extemporan o soluție conținînd în părți egale sol. 2% ferocianură de potasiu și sol. 2% acid clorhidric; 2. sol. apoasă 1% de roșu neutru. **Tehnica:** 1. fixare cu formol, includere în parafină; 2. secțiunile hidratate se tratează cu sol. 1 timp de 15—30 min. schimbînd soluția o dată; 3. spălare cu apă distilată schimbată de trei ori; 4. colorare 3 min. cu sol. 2 (eventual Kernechtrot sau reacția Feulgen); 4. clătire cu apă

Scanned with OKEN Scanner

dist.; deshidratare cu alcool, clarificare cu xilol, montare într-o rășină sintetică (DPX); în balsam de Canada preparatele se decolorează în timp. **Rezultat:** fierul feric (Fe^{+++}) se colorează în albastru, nucleii în roșu.

Reacția albastrului Turnbull, varianta Tirmann-Schmeltzer. **Principiu:** fierul feric (Fe^{+++}) este convertit în fier feros (Fe^{++}) cu ajutorul sufurii de amoniu, iar sulfura feroasă este transformată, cu ajutorul fericianurii de potasiu în fericianură feroasă sau albastru Turnbull. **Reactivi:** 1. sulfură galbenă de amoniu diluată extemporan cu 5—10 vol. apă dist.; 2. sol. proaspăt preparată din fericianură de potasiu 20% și acid clorhidric 1% în părți egale; 3. sol. apoasă de Kernechtrot. **Tehnica:** 1. fixare cu formol neutralizat, includere în parafină; 2. tratarea secțiunilor hidratate timp de 1—3 ore cu sol. 1; 3. spălare prelungită cu apă dist.; 4. tratare cu sol. 2 timp de 15 min.; 5. spălare cu apă dist.; 6. colorare nucleară; 7. spălare cu apă dist., 8. deshidratare, clarificare, montare în medii sintetice. **Rezultat:** depozitele de ioni feroși și ferici (convertiți) apar în albastru închis. **Observații:** dacă se exclude tratamentul cu sulfură de amoniu și secțiunile sînt tratate 15—30 min. o sol. formată în părți egale de fericianură de potasiu sol. 20% și acid clorhidric sol. 1% (continuare de la punctul 3), se evidențiază numai fierul feros (Fe^{++}). Specificăm că în organismele vertebratelor predomină net fierul feric.

Metoda pentru fierul hemosiderinic (Macalum, Mallory, Bunting). **Reactivi:** 1. hematoxilină 10 mg; alcool etilic absolut 2 ml; apă dist. 4 ml; 2. sol 10% sulfură galbenă de amoniu; 3. carmalaun Mayer. **Tehnica:** 1. fixare cu formol, includere în parafină;

Scanned with OKEN Scanner

2. secţiuni deparafinate şi hidratate se tratează o oră cu sol. 2; 3. spălare cu apă dist.; 4. colorare 2—6 ore cu sol. 1; 5. spălare cu alcool absolut, alcool 50° şi apă dist.; 6. colorare cu carmalaun Mayer 1—6 ore; 7. deshidratare, clarificare, montare în medii sintetice. **Rezultat:** hemosiderina se colorează în albastru-negru, nucleii în roşu.

METODA PENTRU FERITINĂ ŞI APOFERITINĂ (GRANICK). Partea protidică a feritinei (apoferitina) poate fi decelată prin faptul că formează, prin tratament cu sulfat de cadmiu, cristale octaedrice galbene caracteristice. Valoarea localizatoare a metodei este redusă. Se utilizează secţiuni prin congelare, din probe nefixate, tratate cu o sol. apoasă 10% de sulfat de cadmiu, timp de 12 ore la temp. camerei. Examenul microscopic se face prin montare în aceeaşi soluţie.

PROCEDEE PENTRU DEMASCAREA FIERULUI. Se practică după fixare cu formol neutru şi includere în parafină. Secţiunile deparafinate şi hidratate se tratează cu unul din procedeele ce urmează: a) tratare 2—15 zile cu o sol. 50% sulfură galbenă de amoniu; spălare cu apă distilată; b) tratare cîteva ore cu un amestec de 96 ml alcool 90° şi 4 ml ClH conc.; spălare cu alcool 90° apoi cu apă dist.; c) tratare 30 min. cu apă oxigenată 30% alcalinizată cu carbonat de sodiu sau amoniac diluat, spălare cu apă curentă apoi cu apă dist. După acest tratament secţiunile sînt supuse la una din reacţiile pentru decelarea fierului ionic (după demascarea cu sulfură de amoniu se aplică doar metoda albastrului Turnbull). Fierul hemoglobinei nu poate fi demascat.

PROCEDEE PENTRU ELIMINAREA FIERULUI TISULAR. Se aplică în vederea efectuării preparatelor de control. Secţiunile deparafinate şi hidratate se tratează

Scanned with OKEN Scanner

în unul din următoarele moduri: a) sol. 5% de acid oxalic timp de 2—5 ore; b) sol. 10% acid sulfuric timp de 24 ore; c) sol. 2,4 N acid clorhidric (20 ml HCl conc. la 100 ml apă timp de 24 ore; d) sol. 1% dithionit de sodiu în tampon acetat 0,2 M cu pH 4,5 timp de 5 minute.

FOSFOR

Ca și fierul, acest element există în țesuturi sub formă ionică, accesibilă unei detectări directe și sub formă mascată (combinații organice), evidențiabilă doar după o prealabilă demascare, operație greu de realizat fără să se producă importante modificări topochimice. Tehnicile existente evidențiază fosforul ionic în combinațiile sale anorganice (fosfați anorganici).

Metoda Chang cu molibdat de amoniu. **Principiu:** reactivul formează cu grupele fosforice ale fosfaților anorganici fosfomolibdat de amoniu de culoare albastră. **Reactivi:** 1. sol. 0,005 N acid sulfuric 100 ml; molibdat de amoniu 1,5 g; se aduce reacția la pH 4,0 cu un volum egal de tampon acetat pH 4,0, adăugat doar în momentul întrebuințării. **Tehnica:** 1. probe mici (1 mm) se fixează în formol 50% neutralizat înainte de folosire, prin trecere printr-o coloană cu rășini schimbătoare de ioni; 2. secționare prin congelare la grosimea de 20—50 microni; 3. clătire într-un tampon acetat pH 4 (sol. 0,1 N acid acetic și 0,025 N acetat de sodiu); 4. tratare cu sol. 1 timp de 10 min. la 37°C; 5. se aduc secțiunile pe lame curate, nealbuminizate, sugativare cu hîrtie de filtru, montare în sol. 2% acid ascorbic cu pH 4,0, ajustat tot cu tampon acetat; se examinează imediat. **Rezultat:** fosfații anorganici apar în albastru.

Scanned with OKEN Scanner

Metoda serra-feigl, pe secțiuni la parafină. **Reactivi:** 1. amestec în părți egale de sol. 5% molibdat de amoniu și sol. 1% acid azotic; 2. apă distilată 100 ml; acid acetic glacial 10 ml; benzidină 0,05 g; 3. sol. apoasă 30% acetat de sodiu. **Tehnica:** 1. fixare cu formol, includere în parafină; 2. secțiuni hidratate se tratează 3—5 min. cu sol. 1; 3. spălare cu apă curată; 4. tratare cu sol. 2 timp de 1 min.; 5. se varsă sol. 2 și se spală cu sol. 3; 6. montare pe lame nealbuminizate, în sol. 3; examinare imediată. **Rezultat:** ca în tehnica precedentă, doar că localizarea este mai puțin fidelă.

IOD

Nu există metode chimice acceptabile pentru evidențierea iodurilor în secțiuni histologice. Pentru iodul tiroidian se recurge la autohistoradiografie sau spectografie de absorbție în ultraviolet.

MAGNEZIU

Detectarea histochimică a magneziului prezintă interes mai ales în histochimia vegetală.

Metoda cu galben titan. **Principiu:** reactivul formează cu hidroxidul de magneziu compuși de culoare roșie. **Reactivi:** 1. sol. apoasă 0,2% galben Titan; 2. sol. 2 N hidroxid de sodiu. **Tehnica:** 1. fixare cu formol 10%, secționare prin congelare sau includere în parafină; 2. se acoperă secțiunea cu cîteva picături din sol. 1; 3. se adaugă o cantitate egală din sol. 2 și se lasă 45—60 min.; 4. se varsă reactivul, deshidratare cu alcool, clarificare cu xilol, montare în medii sintetice. **Rezultat:** sărurile de magne-

Scanned with OKEN Scanner

ziu apar în roşu viu; coloraţia nu se păstrează mai mult de 24 ore.

Metoda cu magneson. **Principiu:** reactivul formează cu sărurile de magneziu compuşi de culoare albastră-intens. **Reactivi:** sol. 1% magneson (p-Nitrobenzen-azo-1-naftol) în sol. 5% NaOH (pH 12,2). **Tehnica:** 1. secţiuni din probe nefixate sau fixate cu formol şi secţionate prin congelare, eventual fixare cu formol sau lichid Carnoy şi includere în parafină; 2. tratare 30—60 min. la 56—60°C cu sol. 1; 3. spălare cu o sol. diluată de NaOH; 4. deshidratare, clarificare, montare în medii sintetice. **Rezultat:** sărurile de magneziu apar colorate în albastru intens.

MANGAN

Metoda Grundland-Bulliard cu hidroxi-8-quinoleină. **Principiu:** reactivul formează cu sărurile de mangan un compus de culoare galbenă în mediul reducător şi brun-negru în mediul oxidant. **Reactivi:** 1. hidroxi-8-quinoleină 2 g; acid acetic glacial 5 ml; apă dist. 100 ml. **Tehnica:** 1. fixare cu alcool, secţionare prin congelare sau includere în parafină; 2. secţiuni hidratate se acoperă cu o picătură de acid acetic glacial la care se adaugă cîteva picături de sol. 20% acetat de sodiu; 3. tratare cu sol. 1 timp de 3—5 min.; 4. se varsă reactivul şi se lasă secţiunile la aer 2—5 min.; 5. se acoperă cu două picături de amoniac 25%; 6. spălare cu apă şi montare în sirop Apathy. **Rezultat:** sărurile de mangan se colorează în brun-negru. **Variantă:** punctul 1 şi 2 ca mai sus; 3. tratare cîteva minute cu sol. apoasă 10% de hidroxilamină; 4. tratare 3—5 min. cu sol. 1; 5. tratare în continuare ca mai sus, de la

Scanned with OKEN Scanner

punctul 5 inclusiv. **Rezultat:** sărurile de mangan se colorează în galben.

MERCUR

Prezenţa mercurului în ţesuturi este posibilă prin administrare experimentală, terapeutică sau accidentală.

METODA LOMBARDO CU CLORURĂ STANOASĂ. **Principiu:** reactivul formează cu sărurile de mercur granule negre de mercur metalic. **Reactivi:** 1. clorură stanoasă 25 g; acid clorhidric concentrat 25 ml; apă dist. 75 ml. **Tehnica:** 1. fixare cu formol, alcool sau lichid Carnoy; 2. spălare cu apă dist.; 3. tratare 12—24 ore cu sol. 1; 4. spălare repetată cu apă dist.; 5. includere în parafină, secţionare, deparafinare, colorare de fond facultativă, montare în balsam. **Rezultat:** mercurul apare sub formă de granule negre.

METODA CAMBAR CU HIDROGEN SULFURAT. **Principiu:** hidrogenul sulfurat formează cu mercurul sulfură neagră de mercur. **Reactivi:** 1. alcool 96° 40 ml; apă dist. 60 ml; acid clorhidric 50 ml. **Tehnica:** 1. fixare în alcool-formol-acid acetic 24—36 ore (pag. 27); 2. includere în parafină; 3. secţiuni hidratate se tratează 6 ore cu sol. 1, prin care, în tot acest timp, se trece un curent de hidrogen sulfurat (dintr-un aparat Kipp); spălare repetată cu alcool 70°, deshidratare, clarificare, montare în balsam. **Rezultat:** sărurile de mercur apar sub formă de granule negre-brune.

NICHEL

Acest metal se află în cantităţi extrem de reduse în ţesuturile animale. În cazul administrărilor expe-

Scanned with OKEN Scanner

rimentale este prudent să se efectueze preparate de control pe probe de la animalul martor.

Metoda Feigl cu dimetilglioxim. **Principiu:** reactivul formează cu nichelul cristale roșii caracteristice. **Reactivi:** 1. sol. 1% dimetilglioxim în alcool 70° 1 ml; alcool 70° 10 ml; 2. sol. apoasă 20% glucoză 20 p; sol. 1% dimetilglioxim în alcool 70° 1 p; se amestecă agitîndu-le puternic. **Tehnica:** a) pentru secțiuni la parafină: 1. fixarea cu sol. 1 timp de 24 ore; 2. deshidratare cu benzoat de metil, clarificare cu benzen, includere în parafină, secționare, deparafinare, montare; b) pentru secțiuni la criotom: 1. secțiuni din probe proaspete se depun pe lame uscate și se acoperă cu cîteva picături din sol 2; 2. se acoperă cu lamela și se examinează imediat. **Rezultat:** în ambele cazuri, prezența nichelului este semnalată de apariția unor cristale roșii.

PLUMB

Cercetarea histochimică a plumbului prezintă interes mai ales pentru examinările histopatologice sau în scopuri experimentale.

Metoda Cretin-Fairhall cu cromat de potasiu. **Principiu:** în contact cu soluții de cromat de potasiu sau bicromat de potasiu, sărurile de plumb se transformă în cristale galbene de cromat de plumb. **Reactivi:** 1. cromat de potasiu 2 g; sol. apoasă 1% acid acetic; 2. sol. apoasă 0,5% albastru de toluidină. **Tehnica:** a) pentru țesuturi proaspete: 1. probe mici se fixează 24—48 ore în fixatori pe bază de bicromat (Regaud, Orth, Müller); 2. spălare în apă curentă 6 ore; 3. deshidratare, clarificare, includere în parafină, secționare la 5 microni; 4. secțiuni hidratate se colorează 1 min. cu sol. 2; 5. des-

Scanned with OKEN Scanner

hidratare, clarificare, montare în medii sintetice. b) pentru probe fixate cu formol sau alcool și incluse în parafină: 1. deparafinare, hidratare; 2. tratare, cîteva zile, cu sol. 1; 3. se continuă ca mai sus, de la punctul 3 inclusiv. **Rezultat:** sărurile de plumb sînt semnalate de cristalele galbene de cromat de plumb pe fondul albastru al secțiunii.

METODA CU RHODIZONAT DE SODIU (MOLNAR, GEDIGK, PIOC[H]

Principiu: reactivul formează cu sărurile de plumb un produs de chelare brun-roșcat. **Reactivi:** 1. rhodizonat de sodiu 0,2 g; sol. apoasă 1% acid acetic 100 ml; se prepară extemporan. 2. verde luminos 0,1 g; sol. apoasă 1% acid acetic 100 ml. **Tehnica:** a) pentru țesutul osos: 1. decalcificare cu sol. 5—10% acid sulfuric conținînd și sulfat de sodiu în proporție de 5—10% (sărurile de plumb sînt transformate în sulfat de plumb insolubil); secționare prin congelare sau includere în parafină; b) pentru probe fixate în formol și secționate prin congelare; 1. secțiuni de 15—20 microni se trec direct în sol. 1 pentru 30—60 min.; c) pentru probe nefixate, secționate prin congelare: 1. tratare 30—60 min. cu sol. 1 la care se adaugă formol conc. în proporție de 10%. În toate cazurile se practică la sfîrșit o colorare de fond, 30 sec., cu sol. 2, urmată de spălare și montare în medii apoase (glicerogel). **Rezultat:** sărurile de plumb apar colorate în roșu-brun pe un fond verde.

POTASIU

Metodele pentru evidențierea potasiului sînt specifice dar artefactele de difuziune sînt greu de evitat.

Scanned with OKEN Scanner

Se va da preferință pregătirii materialului prin congelare-deshidratare.

Metoda Macallum-Gersch. **Principiu:** potasiul tisular, în prezența cobalthexanitritului de sodiu, precipită sub formă de cristale galben-oranj de cobalt-nitrit mixt de sodiu și potasiu. Unele variante opresc reacția în această fază, altele recomandă transformarea produsului reacției în sulfură de cobalt brună-negricioasă, cu ajutorul sulfurii de amoniu. Se consideră că artefactele de difuzare și solubilizare au loc mai ales în această ultimă etapă a reacției. **Varianta Crout-Jennings. Reactivi:** 1. sol. A: 50 ml. apă dist; 25 mg nitrat de cobalt; 12,5 ml acid acetic glacial; 2. sol. B: 180 ml apă dist.; 120 g nitrit de sodiu; 3. sol. de lucru se prepară adăugînd la sol. A 210 ml din sol. B; se barbotează cu aer timp de 1—2 ore, pentru a se elimina oxidul nitric, după care se conservă în frigider; înainte de folosire se filtrează. **Tehnica:** 1. secțiuni de 10 microni din probe tratate prin congelare-deshidratare, se deparafinează imediat în 2 băi cu eter de petrol, la temp. laboratorului; se transferă secțiunile pe lame uscate, nealbuminizate și se așteaptă evaporarea eterului de petrol; se acoperă secțiunea cu hîrtie de filtru și se presează ușor; 2. tratare cu sol. 3 timp de 15 min., în frigider la +4°C; 3. se scurge reactivul și se spală rapid (15 sec.) în două băi de apă dist. răcită la +4°C, pînă cînd nu se mai elimină colorant galben, după care se mai spală încă 15 sec. în a treia baie; 4. deshidratare 2×3 min. cu alcool 96° și 2×5 min. cu alcool absolut; 5 clarificare 2×5 min. cu xilol, montare într-un mediu sintetic. **Preparatul martor:** înainte de tratare cu sol. 3 se ține secțiunea în apă rece timp de 30 min., după care se tratează în continuare ca mai sus. **Rezultat:** prezența și localizarea

Scanned with OKEN Scanner

potasiului este semnalată de cristalele galbene-cafenii de cobaltnitrit. Acestea se observă mai bine în contrast de fază. În preparatul martor, cristalele trebuie să lipsească.

Varianta V. D. Mârza și L. Chiosa (1934) recomandă efectuarea reacției pe secțiuni din probe fixate în alcool-formol; după tratamentul cu cobalt nitrit de sodiu, spălarea cu apă este înlocuită, fie cu lichidul lui Leulier (12 ml alcool 96°; 12 ml eter; 1 ml acid acetic glacial; 6 ml apă dist.), fie, mai bine, cu alcool 50°; vizualizarea reacției se face cu sulfură de amoniu (ca în metoda Macallum), urmată de spălare cu apă distilată, deshidratare, clarificare și montare în balsam. **Rezultat:** potasiul este semnalat de prezența sulfurii de cobalt. **Preparatul de control** se face tratînd secțiunea direct cu sulfură de amoniu, fără tratare prealabilă cu cobalt nitrit de sodiu; în felul acesta se poate aprecia interferența fierului în reacție.

SODIU

Localizarea histochimică a sodiului nu este încă realizată în mod satisfăcător, artefactele de difuzie fiind greu de evitat.

Metoda Tanert. **Principiu:** formarea unui acetat triplu de uranil, zinc și sodiu, acesta din urmă fiind fluorescent. **Reactivi:** 1. acetat de uranil 32 g; acetat de zinc ($2H_2O$) 100 g; acid acetic glacial 10 ml; alcool etilic 96° 500 ml; apă dist. ad 1000 ml; la utilizare se diluează 1 : 5 cu apă dist. **Tehnica:** 1. probe proaspete, mici (3 mm) se secționează la criotom, la grosimea de 8 microni. Se transferă secțiunea pe o lamă uscată, se depune într-un recipient metalic etanș, în care se realizează un vid moderat, cu o

Scanned with OKEN Scanner

pompă de vid; acest tratament durează 15 min. şi se face la —20°C; 2. tratare cu sol. 1 timp de 24 ore, în frigider; 3. spălare cu acetonitril, montare în glicerină şi examinare imediat în ultraviolet. **Rezultat:** fluorescenţă galbenă-verde, ce persistă doar cîteva ore.

STRONŢIU

METODA WATERHOUSE CU RODIZONAT DE SODIU a fost expusă la metodele pentru bariu (pag. 79). Pentru diferenţierea stronţiului se procedează comparativ: pe o secţiune se exclude tratamentul cu acid clorhidric, deci se va evidenţia bariul şi stronţiul. Pe altă secţiune se aplică acest tratament care va elimina stronţiul, dar se va păstra bariul. Se mai poate proceda prin eliminarea bariului cu cromat de potasiu, înainte sau după tratamentul cu rodizonat.

ZINC

Acest metal prezintă o importanţă biologică deosebită: este un element esenţial în structura insulinei şi a anhidrazei carbonice, precum şi un activator a numeroase enzime.

METODA OKAMOTO, VARIANTA MAGER, cu difenilthiocarbazonă (dithizon). **Principiu:** reactivul formează cu zincul un complex colorat specific. **Reactivi:** 1. ditizonă 10 mg; acetonă p. a. 100 ml; se păstrează la rece şi întuneric; 2. tiosulfat de sodiu 55 g; acetat de sodiu 9 g; cianură de potasiu 1 g; apă dist. 100 ml. Amestecul tampon se pune într-o pîlnie de decantare şi se spală de cîteva ori cu o sol. de ditizonă în tetraclorură de carbon, pînă cînd stratul de tetraclorură rămîne verde clar; prin aceasta s-a fă-

Scanned with OKEN Scanner

cut eliminarea eventualelor urme de zinc din reactiv; după spălare se decantează sol. tampon; 3. sol. 20% de tartrat dublu de sodiu și potasiu; 4. acid acetic normal. **Tehnica:** 1. se pot utiliza secțiuni din probe fixate la rece cu alcool absolut și incluse în parafină, secțiuni de probe tratate prin congelare-deshidratare sau secțiuni la microtomul cu congelare; 2. secțiunile se aduc pe lame uscate și se lasă să se usuce la temp. laboratorului; 3. tratare 5—10 min. cu un amestec preparat extemporan din: 24 ml sol. 1; 18 ml apă dist. (se aduce cu acid acetic la pH 3,7); 5,8 ml sol. 2 și 0,2 ml sol. 3; amestecul nu se conservă și poate fi folosit o singură dată; 4. clătire cu cloroform; 5. clătire rapidă cu apă dist.; 6. montare în mediu apos (sirop Apathy etc.). **Rezultat:** zincul apare sub formă de granule roșii-purpurii sau ca o colorație difuză.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL IV

EVIDENȚIEREA HISTOCHIMICĂ A UNOR PROPRIETĂȚI COMUNE LEGATE DE ANUMIȚI RADICALI ȘI FUNCȚII

Acest capitol va cuprinde colorații sau reacții care evidențiază unele caractere fizico-chimice comune mai multor radicali sau funcții. Este vorba în principal de funcția reductoare sau oxidantă și de caracterele electropolare datorate prezenței anionilor sau cationilor, manifestate prin bazofilie, acidofilie, metacromazie etc.

A. EVIDENȚIEREA HISTOCHIMICĂ A COMPUȘILOR REDUCTORI

În țesuturile animale această funcție este proprie mai ales mono- și polifenolilor, pirolilor, indolilor, acidului ascorbic, hexozelor, acidului uric și derivaților săi, lipidelor nesaturate și derivaților lor de oxidare, precum și compușilor conținînd radicalul carbonil. Prezența funcției lor reductoare este relevată printr-un reactiv adecvat, care în urma reducerii se va transforma într-un produs puternic colorat ce se va depune, fără migrare, chiar la nivelul unde s-a format.

Scanned with OKEN Scanner

Tehnicile din acest grup se bazează pe reducerea unor reactivi ca: fericianura ferică, sărurile de argint și sărurile de tetrazoliu.

a) Metoda Chèvremont-Frederic. **Principiu:** fericianura ferică reacționează în prezența unui reducător slab, prin formarea unui precipitat de verde de Prusia, iar în prezența unui reducător mai puternic, prin formarea de albastru de Prusia sau fericianură ferică. **Reactivi:** 1,25 ml sol. 0,1% fericianură de potasiu: 75 ml sol. 1% de sulfat feric. **Tehnica:** 1. fixare cu formol, formol salin sau Bouin (nu mai mult de 48 ore); fixatorii cu sublimat sînt contraindicați: 2. secțiuni prin congelare sau după includerea rapidă în parafină; 3. secțiunile prin congelare se tratează pe stativ cu sol. 1 de 3×3—6 min.; cele la parafină de 3×10 min.; 4. spălare cu apă curentă 10—15 min.; 5. colorare nucleară cu Kernechtrot (facultativ); 6. montare în mediu apos sau deshidratare și clarificare obișnuită, montare în medii sintetice. **Rezultat:** prezența grupărilor reducătoare energice se manifestă printr-o coloratie albastră. Grupările slab reducătoare dau o coloratie verde; glucidele reducătoare și aldehidele nu reacționează cu fericianura ferică.

b) Metoda Adams, cu rezultat similar, diferă prin compoziția reactivului și durata de acțiune: sol. 1% fericianură de potasiu 1 p; sol. 1% clorură ferică 3 p; durata tratamentului 5 minute.

Observații: reactivul se prepară extemporan (chiar și cele două soluții de bază) și trebuie filtrat înainte de întrebuințare; durata de conservare este de maximum 10 min.; se va feri de lumină puternică și de contactul cu obiectele metalice. Preparatele montate în balsam de Canada se conservă doar cîteva săptămîni.

Scanned with OKEN Scanner

c) Reacția argentafină Masson. **Principiu:** anumiți agenți reducători reduc săruri complexe de argint, ca hidroxidul de argentodiamină din lichidul Fontana, sub formă de argint metalic ce se depune în locurile unde se află agenții reducători (reacția argentafină). **Reactivi:** 1. Lichidul Fontana: într-o sol. apoasă 5% de azotat de argint se picură amoniac, agitînd mereu, pînă exact în momentul în care precipitatul format se redizolvă; se picură apoi, la fel, sol. 5% azotat de argint pînă la apariția unei tulburări opalescente persistente; după depunerea precipitatului albicios, sol. se decantează; corect preparată sol. nu trebuie să miroasă a amoniac. **Tehnica:** 1. fixare cu formol, Bouin etc., includere în parafină; 2. secțiuni deparafinate, colodinate și hidratate se spală cu apă distilată, schimbată de mai multe ori, timp de 2 ore; 3. tratare cu lichid Fontana la întuneric, într-un recipient închis, timp de 24—36 ore (se va aprecia prin control microscopic); 4. spălare repetată cu apă dist.; 5. virare cu sol. apoasă 0,1% clorură de aur, timp de 5 min.; 6. clătire cu apă dist.; 7. fixare 1 min. cu sol. apoasă 5% tiosulfat de sodiu și spălare 5 min. cu apă dist; 8. colorare nucleară cu Kernechtrot (facultativ); 9. deshidratare și clarificare obișnuită, montare în balsam sau o rășină sintetică. **Rezultat:** prezența compușilor reducători este relevată de prezența unui precipitat negru sau negru-cafeniu.

d) Reacția cu argint-hexametilentetramină. varianta Lillie-Burtner. **Principiu:** ca la precedenta, doar că sarea complexă de argint este argentometenamina care este mai ieftină, acționează mai rapid și se conservă mai bine. **Reactivi:** 1. sol. apoasă 3% hexametilentetramină 100 ml; sol. apoasă 5% nitrat de argint 5 ml; se agită pînă la dizolvarea pre-

Scanned with OKEN Scanner

cipitatului format; se conservă la rece și întuneric, cîteva luni; 2. tampon borat pH 7,8: sol. 1,24% acid boric 16 ml; sol. 1,9% tetraborat de sodiu decahidratat 4 ml; 3. sol. Lugol; 4. sol. 5% tiosulfat de sodiu. **Tehnica:** 1. fixare cu formol, Bouin sau similare, includere în parafină; 2. secțiuni deparafinate, colodinate, hidratate se tratează 10 min. cu sol. 3 apoi se albesc cu sol. 4; 3. spălare 10 min. cu apă curentă; 4. clătire de 2 ori cu apă dist.; 5. tratare în recipiente închise, în etuvă, la 60°C cu amestecul: 30 ml sol. 1 și 8 ml sol. 2, preparat extemporan; dacă amestecul este în prealabil adus la temp. de 60°C, durata tratamentului este de 30—60 min. și de aprox. 3 ore dacă la introducerea în etuvă sol. are temp. laboratorului; 6. clătire cu apă dist. apoi ca în tehnica precedentă de la punctul 5 inclusiv. **Rezultat:** ca în metoda Masson. **Observații:** 1. la prepararea sol. cu săruri complexe de argint se va utiliza azotat de argint p.a. și apă bidistilată; 2. sticlăria va fi spălată chimic; 3. durata optimă de acțiune a sol. argentice se va stabili prin verificare; la o durată insuficientă avem o eroare „prin lipsă" de reacție, pe cînd la o durată prea mare se produce impregnarea unor structuri argirofile ca nucleii, fibrele colagene și musculare, granule de secreție etc., iar în preparat apar precipitate grosiere; într-un preparat reușit fondul trebuie să fie incolor sau gălbui; 4. virarea cu clorură de aur nu este obligatorie; preparatele se păstrează mai bine, dar intensitatea reacției este ușor atenuată; 5. reducerea sol. de argint este produsă mai ales de orto- și parapolifenoli, aldehide (care nu reduc fericianura ferică), acid uric, uraţi, acid ascorbic, hexoze reducătoare și 5-hidroxitriptamina; thioli reducători puternici ai fericianurii ferice, nu dau reacția argentafină.

Scanned with OKEN Scanner

e) Metoda Gomori cu săruri de tetrazolium. **Principiu:** sărurile de tetrazolium sînt compuși care în stare oxidată sînt slab colorați și solubili, dar care devin insolubili și intens colorați în stare redusă (formazan). În scopul evidențierii compușilor cu funcții reducătoare, sărurile de tetrazolium trebuie folosite într-un mediu foarte alcalin. **Reactivi:** 1. se prepară extemporan, dizolvînd substanțele în ordinea indicată: apă dist. 15 ml; cianură de sodiu 1 g; 20 ml tampon de borat pH 8,5—8,8; sol. N/1 acid acetic 15 ml; sol. 0,5% neotetrazolium în alcool etilic absolut 5 ml; la rece și întuneric sol. se conservă cîteva zile. **Tehnica:** 1. fixare cu formol, includere în parafină; 2. secțiuni deparafinate, colodinate, hidratate se tratează 1—2 ore la 60°C cu sol. de neotetrazolium; 3. clătire cu apă dist. și montare într-un mediu apos (sirop Apathy). **Rezultat:** prezența compușilor reducători este indicată de un precipitat fin de culoare purpurie. **Observații:** reacția se poate efectua și cu BT sau nitro-BT (tabelul 8).

B. STUDIUL HISTOCHIMIC AL ACIDOFILIEI

Acidofilia, în înțelesul histochimic al termenului, înseamnă fixarea unor anioni coloranți, la un pH foarte coborît, pe radicalii bazici ai proteinelor tisulare.

a) Metoda Deitch, cu galben naftol-S. **Principiu:** determinarea totalității grupelor bazice ionizate ale proteinelor prin colorare cu un colorant acid, într-un mediu acid, condiții în care toate grupele aminate trec în stare ionizată și fixează colorantul acid. **Reactivi:** 1. sol. 1% galben naftol-S în acid acetic 1%; 2. sol. apoasă 1% acid acetic. **Tehnica:** 1. fixare cu

Scanned with OKEN Scanner

formol neutru 10%, includere în parafină; 2. secţiuni deparafinate, colodinate, hidratate se colorează 15 min. la temp. laboratorului cu sol. 1; 3. diferenţiere în sol. 2 timp de 15—24 ore; 4. sugativare cu hîrtie de filtru; 5. deshidratare cu alcool butilic terţiar, clarificare cu xilol, montare în balsam sau răşini sintetice. **Rezultat:** acumulările de produşi bogaţi în grupări bazice apar colorate în galben. Tehnica se pretează mai ales pentru determinări citofotometrice.

C. STUDIUL HISTOCHIMIC AL BAZOFILIEI

Prin acest studiu se urmăreşte evidenţierea grupărilor acide ionizate ale unei substanţe cu ajutorul unui colorant bazic utilizat în anumite condiţii (concentraţie, pH, durata de acţiune etc.). Principalele grupări chimice care fixează cationii sînt: radicalii sulfat ai mucopolizaharidelor acide, radicalii fosfat ai acizilor nucleici, radicalii carboxil ai proteinelor, ai anumitor glucide şi ai acidului uric, radicalii oxiacid ai derivaţilor de oxidare ai lipidelor. Bazofilia se manifestă numai în cazul în care bilanţul sarcinilor electrostatice este în favoarea anionilor. În accepţiunea histochimică a cuvîntului, bazofilia este un fenomen cu caracter polifactorial. Factorii care pot influenţa în cea mai mare măsură fenomenul sînt fixarea şi pH-ul sol. colorante. Fixatorul preferat este în general formolul 10% iar pH-ul sol. colorante se alege inferior valorii punctului izoelectric al majorităţii protidelor tisulare, adică pH 4,6—4,2. Coloranţii utilizaţi sînt tiazinele: azur A, B, C, albastrul de metilen, thionina şi mai ales albastrul de

Scanned with OKEN Scanner

toluidină. Toți aceștia vor produce și fenomenul de metacromazie (vezi pag. 111). Conducerea coloraţiei se face numai progresiv căci diferenţierea, în cazul colorării regresive, falsifică rezultatul.

Metoda cu albastru de toluidină. **Reactivi:** 1. sol. apoasă 0,2% de albastru de toluidină (sau altă tiazină) în tampon Walpole pH 4,2: 2. sol. apoasă 5% molibdat de amoniu. **Tehnica:** 1. fixare cu formol 10%; includere în parafină sau secţionare la microtomul cu congelare sau la criotom; 2. secţiuni deparafinate, colodinate, hidratate se colorează 5 min. cu sol. 1; 3. clătire rapidă cu tampon Walpole pH 4,2; 4. montare în sol. tampon sau în glicerogel și examen imediat sau tratare 5 min. cu sol. 2, spălare 3—5 min. cu apă, deshidratare cu alcool etilic, clarificare cu xilol, montare într-un mediu sintetic. Este mult mai bine să se facă deshidratarea cu alcool butilic terţiar. În acest caz după punctul 3 urmează sugativarea cu hîrtie de filtru, deshidratare cu alcool butilic 2×20 sec., xilol, montare. **Rezultat:** prezenţa compușilor bazofili este semnalată de o coloraţie albastră (ortocromatică), violetă sau purpurie (metacromatică).

D. DETERMINAREA ZONEI PUNCTULUI IZOELECTRIC AL PROTEINELOR TISULARE

În lanţurile moleculare proteice, mai cu seamă în cele laterale există unele grupări ionizabile electropozitiv (amino-, guanidil, imidazol) și altele electronegativ (carboxil). Caracterul electropolar al proteinelor este mult influenţat de pH-ul sol. în care se află: cînd acesta coboară crește numărul sarcinilor pozitive iar cînd crește scade numărul sarcinilor

Scanned with OKEN Scanner

negative. La un anumit pH caracteristic fiecărei proteine, sarcinile pozitive și negative se egalizează, iar proteina pusă într-un cîmp electric nu va migra spre nici unul din poli. Valoarea acestui pH definește punctul izoelectric. Modificarea pH-ului unei sol. colorante va influența deci gradul de legare al proteinelor cu coloranții anionici sau cationici, respectiv acizi sau bazici. Tratarea separată a unor secțiuni seriate dintr-un țesut oarecare cu un colorant bazic și cu unul acid, din care s-au făcut mai multe soluții, de aceeași concentrație dar la un pH diferit, ne arată că un colorant acid colorează cu o intensitate descrescîndă atunci cînd pH-ul soluției crește, iar cel bazic cu o intensitate crescîndă. Reprezentînd grafic intensitatea colorației (eventual evaluată histofotometric) la diferite pH-uri pentru ambii coloranți, se va constata o zonă în care cele două curbe se încrucișează. Ea reprezintă, cu aproximație, punctul izoelectric al proteinei respective și aceasta coincide cu varianta cu minimum de colorabilitate a celor doi coloranți.

METODA LIPP PENTRU DETERMINAREA ZONEI PUNCTULUI IZOELECTRIC. **Reactivi:** 1. sol. mamă de albastru de metilen: 0,13 g albastru de metilen în 100 ml apă dist. fiartă; 2. sol. mamă de Ponceau cristalizat: 0,18 g în 100 ml apă dist. fiartă; 3. tampon de acetat-veronal sodic Michaelis: se vor prepara sol. tampon crescînde (cu 0,25 unități) eșalonate între pH 2—7; 4. sol. apoasă 5% molibdat de amoniu. **Tehnica:** 1. fixare cu formol, alcool-formol, Bouin, includere în parafină; 2. secțiunile se etalează cu apă dist. pe lame nealbuminizate; din panglica cu secțiuni facem atîtea perechi de secțiuni învecinate, cîte sol. tampon cu pH-uri diferite avem; 3. se prepară sol. de colorare, făcînd cu fiecare soluție mamă atîtea sol. de lucru cîte tampoane cu pH-uri diferite avem; por-

Scanned with OKEN Scanner

ţiuni din sol. mamă se amestecă cu sol. tampon în părţi egale (de exemplu 2 : 2 ml); din fiecare pereche de secţiuni vecine, una se colorează cu suita de soluţii de albastru de metilen, iar cealaltă cu cea de Ponceau; secţiunile pereche vor avea deci cei doi coloranţi la pH egal; durata colorării cu ambii coloranţi este de 10 min.; 4. spălare rapidă cu tamponul corespunzător fiecărei perechi de secţiuni, diluat 1 : 1 cu apă dist. fiartă; 5. lamele colorate cu albastru de metilen se tratează 10 min. cu sol. 4, după care urmează spălare cu alcool, clarificare cu xilol, montare în medii sintetice; 6. lamele colorate cu Ponceau se clătesc cu apă dist. şi se trec direct la deshidratare. **Rezultat:** prin examenul preparatelor se va aprecia intensitatea coloraţiei structurilor studiate, separat pentru cei doi coloranţi şi pentru diferite pH-uri. Zona de pH ce corespunde dispariţiei afinităţii pentru Ponceau şi apariţiei celei pentru albastrul de metilen, ne indică zona punctului izoelectric. Structurile conţinînd grupări acide puternice îşi vor conserva bazofilia chiar la un pH foarte coborît. Astfel, dintre polizaharidele cu funcţii acide, sulfomucopolizaharidele apar bazofile la pH 2, la care restul structurilor sînt aproape incolore. Bazofilia mucopolizaharidelor acide avînd numai radicalul carboxil se manifestă la pH 4; cea a acizilor nucleici la pH 2,5; a derivaţilor de oxidare ai lipidelor la pH 2,5—3; a pepsinei glandelor fundice la pH 3,3; a acidului uric şi a derivaţilor săi la pH 4, iar a majorităţii proteinelor tisulare în jurul la pH 5. Studiul bazofiliei şi determinarea zonei punctului izoelectric relevă deci prezenţa grupărilor anionice şi prin aceasta obţinem informaţii de ordin histochimic referitoare la caracteristica electropolară a proteinelor şi a altor substanţe.

Scanned with OKEN Scanner

E. STUDIUL METACROMAZIEI

Colorarea selectivă a anumitor structuri tisulare sau celulare în altă nuanţă decît cea a soluţiei diluate de colorant se numeşte **reacţie** sau **coloraţie metacromatică.** Factorul celular sau tisular responsabil de schimbarea culorii se numeşte **cromotrop.** Metacromazia este un fenomen complex, legat atît de natura colorantului, cît şi de cea a substratului asupra căruia acesta acţionează. Mecanismul virării metacromatice este suficient de bine cunoscut în cazul producerii în soluţii „in vitro" dar în condiţiile histochimiei el este mult mai complex, prin intervenţia unor factori ce ţin de tehnica preparării ţesuturilor (fixare, deshidratare, montare etc.). În histochimie, fenomenul metacromaziei nu se consideră ca fiind cauzat de grupări chimice specifice, ci de prezenţa sarcinilor electronegative de o anumită densitate pe suprafaţa substanţei cromotrope. Decisivi în producerea fenomenului sînt mai ales trei factori: 1. densitatea la suprafaţa cromotropului a grupelor anionice libere; 2. orientarea moleculelor de colorant; 3. prezenţa moleculelor de apă. Metacromazia nu pare determinată de gradul de polimerizare sau depolimerizare al substanţelor cromotrope. În privinţa densităţii grupelor anionice libere de la suprafaţa cromotropului se consideră că este determinantă o distanţă de minimum 5 Å; diminuarea acestei distanţe atrage intensificarea metacromaziei. Moleculele de colorant se dispun ordonat orientate pe suprafaţa cromoforului, stabilind între ele noi legături (polimerizare favorizată de prezenţa moleculelor de apă) şi prin aceasta se produce o deplasare a benzii spectrale, deci schimbarea culorii. Fiind vorba de un proces electrostatic este necesară disocierea grupărilor

Scanned with OKEN Scanner

participante, lucru ce se realizează mai bine într-un mediu apos. Astfel se explică faptul că prin dizolvarea colorantului în alcool, uneori metacromazia este suprimată. Acest lucru este important în ce privește alegerea procedeului tehnic (cu sau fără recurgere la deshidratare în cursul includerii și montării). Prezența în sol. colorantă a cationilor (soluții saline), chiar în concentrații foarte mici, precum și a proteinelor solubile, inhibă sau suprimă metacromazia, căci intră în competiție cu cationii mari ai colorantului în fixarea la grupele anionice ale cromotropului. Acest fenomen este în mare măsură influențat de pH-ul soluției colorante. Astfel se explică faptul că matricea anorganică osoasă devine metacromatică abia după decalcificare sau că metacromazia inhibată de prezența unor proteine poate fi relevată după un tratament cu enzime proteolitice (pepsina poate demasca metacromazia unor mucopolizaharide acide).

În baza celor expuse mai sus, putem conchide că valoarea informativă a metacromaziei este mai mare decît a bazofiliei, căci ea nu ne indică doar prezența grupărilor acide într-o substanță dată, ci și densitatea și chiar natura acestora. Mai mult chiar, apariția sau dispariția metacromaziei unor structuri pe parcursul diferențierii lor în timp ne relevă un proces de „maturare" sau „îmbătrînire" moleculară. Așa de exemplu, substanța fundamentală conjunctivă și cartilaginoasă, anumite mucine și granulațiile mastocitelor devin tot mai metacromatice în decursul ontogenezei, prin echiparea lor cu un număr mai mare de grupări acide.

Substanțele care produc metacromazia în mod obișnuit aparțin următoarelor trei grupe: mucopolizaharide acide, acizi nucleici și lipide cu caracter

Scanned with OKEN Scanner

acid. Sînt mai intens metacromatice substanţele care conţin grupări sulfatate şi mai slab metacromatice cele cu grupări anionice carboxilice şi fosfatate. În afară de aceste categorii de substanţe mai există unele care se pretează la inducerea unei metacromazii „secundare" prin transformarea grupărilor —SH şi —S—S— în grupări —SO_3H prin oxidare cu acid performic. Prin aceasta, metodă devine specifică pentru evidenţierea grupărilor amintite.

În afară de natura colorantului şi a substratului, fenomenul metacromaziei mai este în mod hotărîtor influenţat de o serie de factori care ţin de tehnica de lucru. Fixarea influenţează întotdeauna fenomenul şi ea deci trebuie adaptată naturii substanţelor cercetate. Se poate recurge şi la material nefixat, secţionat la criotom sau tratat prin congelare-deshidratare.

Din numărul relativ mare de coloranţi dovediţi ca fiind metacromatici, cei tiazinici dau cele mai bune rezultate, iar dintre aceştia, în special albastrul de toluidină, azur A, albastrul crezyl şi thionina. Se vor utiliza numai sorturi de foarte bună calitate (puritate). Concentraţia soluţiei colorante, ca în orice colorаţie, are o mare însemnătate, căci şi aici se stabileşte un echilibru între moleculele de colorant fixate la cromotrop şi cele rămase libere în soluţie. Sub o anumită concentraţie critică, metacromazia nu se mai poate produce. Acest fenomen poate fi exploatat pentru aprecierea intensităţii metacromaziei unor structuri (utilizînd colorantul într-o serie de diluţii crescînde), deoarece concentraţia de colorant necesară pentru provocarea metacromaziei este în funcţie de încărcarea electrică a substratului. În general, se recurge la diluţii mai slabe (0,01%) pentru elemente cunoscute ca puternic metacromatice şi

Scanned with OKEN Scanner

mai concentrate (0,1%) pentru cele slab metacromatice. Solventul uzual este apa distilată. Este de asemenea important pH-ul soluției, el fiind cuprins între 3—5 și realizat cu tampon fosfatic sau acetic. Uneori se utilizează soluții cu pH eșalonat între 0,5—7 și prin aceasta sînt posibile unele caracterizări diferențiale, mai ales pentru mucopolizaharidele acide.

Durata colorării variază, în funcție de concentrația soluției și de metacromazia substratului, între 10—30 min., durata optimă fiind stabilită prin tatonare.

Majoritatea autorilor recomandă examinarea combinată a secțiunilor: secțiuni examinate direct (între lamă și lamelă) imediat după scoaterea din colorant și secțiuni deshidratate, montate în medii anhidre sau siropuri (Apathy sau levuloză).

La examenul direct (în mediu apos): a) o metacromazie intensă roșie sau purpurie (metacromazie γ) și care apare la un pH foarte coborît, este dată mai ales de prezența esterilor sulfatați (sulfomucopolizaharidele): b) o metacromazie slabă, violetă (metacromazia β) care nu se manifestă la un pH sub 3,4 și care în general nu rezistă la alcool, este dată de prezența grupărilor fosfatice sau de cea a grupărilor carboxilice prezente în număr mare (mucopolizaharide cu funcții carboxil).

La examenul secțiunilor deshidratate sau montate în siropuri: a) metacromazie intensă (γ) indică prezența mai ales a esterilor sulfatați (unii dintre aceștia fiind chiar eliminați de către alcool); b) o metacromazie slabă (β) relevă prezența aproape exclusivă a nucleoproteinelor.

Metacromazia unor lipide cu caracter acid se poate studia doar pe secțiuni la congelare, după o colorare

Scanned with OKEN Scanner

prelungită. Ea nu rezistă la deshidratare și este probabil datorată radicalilor sulfat sau fosfat.

PRACTICA METACROMAZIEI. Fixarea se face cu fixatori adecvați pentru glucide, lipide sau acizi nucleici: formol 10%, formol cu 0,5% clorură de cetil-piridină, formol cu acetat sau nitrat de plumb, Carnoy. Probele se includ în parafină sau se lucrează pe secțiuni la criotom sau din probe tratate prin congelare-deshidratare. Secțiuni hidratate se introduc în colorant la temp. laboratorului. Se recomandă următoarele soluții colorante, cu durata de colorare corespunzătoare:

1. **Albastru de toluidină:** a) în sol. apoasă 0,5% (1—2 ore); 0,1% (4—6 ore) și 0,01—0,03% (5—10 ore); b) în tampon fosfat M/50 cu pH 3—5 în concentrație de 0,1—0,01% (5. min.—1 oră); c) în alcool etilic 30° în concentrație de 0,1% (5—20 min.).

2. **Azur A:** sol. 0,1—0,01% în alcool etilic 30% (10 min.); sol. se prepară extemporan.

3. **Thionină:** la 5 ml apă dist. se adaugă 2 picături din sol. apoasă saturată la cald (5—15 min.).

EXAMINAREA SECȚIUNILOR NEDESHIDRATATE: se scoate lama din colorant, se acoperă cu o lamelă și se examinează (eventual fotografiază) imediat, căci colorantul difuzează repede; ulterior se poate monta în glicerogel.

Examinarea secțiunilor deshidratate: se clătește lama rapid cu apă dist. sau mai bine cu tamponul utilizat, se scurge bine și se deshidratează foarte rapid cu alcool butilic terțiar, se clarifică cu xilol și se montează într-o rășină sintetică (DPX).

Procedee speciale:

a) **Procedeul Lison** pe secțiuni nedeparafinate: 1. secțiuni lipite pe lame nealbuminizate și etalate la

Scanned with OKEN Scanner

cald (fără a topi parafina!) se ţin în colorant (albastru de toluidină 0,1% pH 3—5) timp de 1—24 ore; 2. clătire cu tampon; 3. sugativare cu hîrtie de filtru şi uscare completă în curent de aer; 4. deparafinare cu xilol, montare în DPX.

b) **Procedeul Mowry** pentru substanţe cromotrope hidrosolubile: 1. fixare şi deshidratare cu alcool absolut la 0°C (2×24 ore), clarificare cu toluen, includere în parafină; 2. etalarea secţiunilor prin procedeu uscat; 3. deparafinare cu xilol, alcool absolut, alcool 96°, apoi colorare 5 min. în sol. 0,005% albastru de toluidină în alcool 70°; 4. uscare cu hîrtie de filtru, xilol, montare în DPX.

c) **Procedeul Hess-Hollander pentru preparate permanente.** 1. secţiuni deparafinate, hidratate, se colorează 30 sec. cu sol. 0,25 g albastru de toluidină dizolvat în 100 ml sol. apoasă 0,25% borat de sodiu; 2. clătire cu sol. 0,25% borat de sodiu; 3. tratare 15 sec. cu o sol. formată din 0,5 g bicromat de potasiu în 100 ml sol. apoasă saturată de sublimat; se varsă sol. de bicromat-sublimat de pe lamă, se înlocuieşte cu alta proaspătă pentru încă 2 min.; 4. uscare cu hîrtie de filtru; 5. alcool absolut 10 sec.; xilol 30 sec.; din nou alcool absolut 10 sec. şi sugativare; 6. din nou sol. bicromat-sublimat 30 sec.; 7. clătire cu alcool absolut conţinînd 1% colofoniu, uscare, xilol, montare în balsam.

F. ALTE COLORAŢII PENTRU RADICALII ANIONICI

Este vorba tot de coloranţi bazici cu care se pot evidenţia, prin metode relativ simple, radicalii anionici preexistenţi sau a căror prezenţă este provocată printr-un pretratament adecvat.

Scanned with OKEN Scanner

a) Coloraţia cu fucsină-paraldehidă Gomori. Varianta Gabe. **Prepararea colorantului:** la 100 ml sol. apoasă 0,5% fucsină bazică se adaugă 1 ml HCl conc. şi 1 ml paraldehidă; se lasă la temp. laboratoratorului şi periodic se controlează reacţia de formare a fucsinei-paraldehidei, depunînd o picătură de reactiv pe hîrtia de filtru; se va forma o pată centrală palidă, înconjurată de o aureolă roşie-violetă; procesul este încheiat cînd această aureolă dispare complet sau este foarte redusă. Se filtrează soluţia, iar precipitatul cules se spală de cîteva ori cu apă dist. apoi se usucă în etuvă la 60°C. Se poate păstra ca atare sau dizolvat în alcool 70°, în proporţia de 1,125 g substanţă uscată la 100 ml alcool; dizolvarea se face lent în decurs de 24 ore, după care se adaugă 1 ml acid acetic. Soluţia se conservă foarte mult timp. **Tehnica:** 1. fixare cu formol, alcool-formol etc. şi includere în parafină; 2. secţiuni deparafinate, colodinate în strat foarte subţire, hidratate, se colorează 3—5 min. cu sol. de fucsină-paraldehidă; 3. clătire rapidă cu apă; 4. tratare 10—20 sec. cu sol. 0,5% HCl în alcool 96°; 5. spălare cu apă, deshidratare, clarificare, montare în balsam sau un mediu sintetic. **Rezultat:** se colorează în violet toate structurile bogate în grupări aldehidă, carboxil, grupările acide conţinînd sulf; se colorează întotdeauna şi fibrele elastice (mecanism necunoscut); după un pretratament adecvat, făcut înainte de colorare, se poate face să apară grupări aldehidice în anumite substanţe, care apoi sînt evidenţiate prin colorare (după hidroliză cu HCl se colorează nucleii, după oxidare cu acid periodic se colorează substanţele PAS-pozitive, iar după oxidări ce transformă cisteina în acid cisteic se evidenţiază protidele sulfhidrilate) (vezi tabelul 13).

Scanned with OKEN Scanner

G. REACȚII PENTRU ALDEHIDE ȘI CETONE

În țesuturile animale, grupele aldehidice și cetonice se află rareori în stare liberă, accesibile direct detectării histochimice. În marea majoritate a cazurilor se provoacă, printr-un pretratament adecvat, apariția radicalului carbonil, pornind de la alți radicali, care apoi este evidențiat printr-o reacție specifică. Radicalul carbonil este comun aldehidelor și cetonelor și le conferă o serie de proprietăți chimice asemănătoare, așa încît distincția pe cale histochimică între aldehide și cetone este greu de făcut. De altfel, grupele aldehidice sînt predominante, grupele cetonice fiind prezente doar în hormonii cetosteroizi și în anumiți pigmenți lipidici. Grupe aldehidice libere, evidențiabile histochimic ca atare, întîlnim doar în fibrele elastice, în rest formarea grupelor aldehidice este provocată prin diferite pretratamente (fixare, oxidare, hidroliză etc.) și astfel este posibilă identificarea unor substanțe anumite din grupa proteinelor, acizilor nucleici, lipidelor și pigmenților. În acest capitol sînt prezentate doar reacțiile pentru vizualizarea grupelor carbonil, reacții pe care le vom utiliza deseori ca ultimă fază a unor metode pentru identificarea unui grup mai restrîns de substanțe (acizi nucleici, mucopolizaharide neutre etc.).

Vizualizarea grupelor carbonil se face mai ales prin: 1. tratare cu reactivul Schiff; 2. reducerea complexelor alcaline de argint; 3. condensarea cu p-fenilendiamină; 4. formarea de hidrazone cu fenilhidrazina sau cu hidrazida acidului 2-hidroxi-3-naftoic.

Scanned with OKEN Scanner

1. REACTIVUL SCHIFF

Reactivul Schiff și echivalenții săi stau la baza celor mai sensibile metode din histochimia aldehidelor. Reactivul Schiff se produce prin transformarea fucsinei bazice (pararozanilinei), sub acțiunea acidului sulfuros, într-un compus incolor. În prezența aldehidelor, o moleculă a reactivului se condensează cu două molecule de aldehidă și, în urma unui rearanjament molecular, compusul format devine colorat, culoarea datorîndu-se prezenței unui cromofor chinonic (după alții culoarea caracteristică s-ar datora formării de acid amino-alkylsulfonic).

Prepararea reactivului Schiff. Existența a numeroase rețete reflectă efortul obținerii unui reactiv cît mai sensibil și cu o durată mare de conservare. Ideală este prepararea reactivului Schiff cu pararozanilină pură. În lipsa acesteia se folosește o fucsină bazică de bună calitate.

a) **Metoda Graumann:** se dizolvă 0,5 g pararozanilină pură în 15 ml sol. acid clorhidric normal; se dizolvă 0,5 g metabisulfit de sodiu în 85 ml apă dist.; se amestecă ambele soluții și se lasă 24 ore la temp. laboratorului, timp în care soluția devine limpede, uneori gălbuie; se tratează cu 0,3 g cărbune activat, se agită 1—2 min. apoi se filtrează.

b) **Metoda de Tomasi:** se dizolvă 1 g fucsină bazică în 200 ml apă dist. clocotită (atenție! fucsina se introduce treptat, altfel toată soluția poate fi ejectată din recipient); se fierbe la flacără mică timp de 5 min.; se răcește sol. pînă la exact 50°C, se filtrează, iar la filtrat se adaugă 20 ml sol. HCl normal; se răcește în continuare pînă la 25°C, cînd se adaugă 1 g metabisulfit de sodiu sau potasiu; se lasă 24 ore

Scanned with OKEN Scanner

sol. la întuneric, apoi se purifică cu cărbune și se filtrează ca mai sus.

Observații: indiferent de procedeul folosit, reactivul trebuie să fie limpede și incolor, eventual o ușoară nuanță de galben-pai. Reactivul care după filtrarea finală rămîne roșietic nu se va întrebuința. Conservarea se face în sticle cu dop foarte etanș (să nu se piardă acidul sulfuros), la întuneric și la temp. de +4°C. Reactivul care după utilizări repetate devine de culoare roz nu mai este corespunzător. Chiar incolor fiind, un reactiv mai vechi de o lună își pierde mult din randament.

Echivalenții reactivului Schiff. Cu un număr mare de substanțe, altele decît fucsina bazică se pot prepara reactivi de tipul reactivului Schiff (tabelul 2). Cu unele din aceste substanțe se obțin preparate mai intens colorate, iar altele sînt fluorescente. Modul de preparare: la o sol. apoasă 0,1% pentru coloranții acridinici și 0,5% pentru cei din celelalte grupe se adaugă 0,10—0,25 ml clorură de thionil. Prepararea se mai poate face dizolvînd colorantul în sol.: 5 ml acid clorhidric normal; 5 ml sol. 0,5% metabisulfit de potasiu sau sodiu; apă dist. 90 ml. Decolorarea (parțială) nu are loc decît în cazul fucsinei acide, azur A și C, cristal violet, violet de gențiana, albastru de metilen și thionină. Eventualele precipitate formate se elimină prin filtrare. Durata de conservare pentru echivalenții reactivului Schiff este mai scurtă.

Utilizarea reactivului Schiff și a echivalenților săi: 1. secțiuni din probe fixate (adecvat substanțelor cercetate), incluse în parafină sau secționate prin congelare se supun pretratamentului corespunzător tehnicii alese; 2. tratare

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 2

Principalii coloranți cu care se pot obține echivalenți ai reactivului Schiff
(după K a s t e n)

Denumirea	Grupa	Culoarea la reacție nucleală	Fluorescența
Galben de acridină	Acridină	Galben-verde	+
Acriflavină	Acridină	Galben	+
Phosphină 5G		Galben	+
Phosphină GN		Galben	+
Roșu neutru	Azine	Cafeniu	0
Fenosafranină		Roșu	0
Safranină O		Roșu	0
Crisoidină R	Azoici	Oranj	0
Brun Bismarck R		Cafeniu	0
Albastru crezil briliant	Oxazine	Albastru	0
Auramină O	Fenilmetani	Galben	+
Violet de metil		Violet	0
Cristal violet		Albastru-violet	0
Fucsină acidă		Roșu	0
Thionină	Tiazine	Albastru	0
Azur A		Albastru	0
Albastru de metilen		Albastru-verde	0
Albastru de toluidină		Albastru-verde	0
Pironină B	Xantene	Roșu	+
Rhodamină 3 GO		Roșu	+

cu reactiv Schiff (sau echivalenți) timp de 15—30 min.; 3. spălare în trei băi de acid sulfuros cîte 2 min. în fiecare; sol. de acid sulfuros se prepară extemporan din: 10 ml sol. apoasă 10% bisulfit de sodiu sau metabisulfit de sodiu (sau potasiu); 10 ml HCl normal și 200 ml apă dist.; 4. spălare cel puțin 10 min. cu apă curentă; în decursul spălării colorația se intensifică; 5. colorație nucleară (facultativ) sau combinație cu o altă reacție histochimică; spălare, deshidratare, clarificare și montare în balsam.

Scanned with OKEN Scanner

Rezultat: cu reactivul Schiff structurile ce conţin carbonili primari se colorează în roşu-violet. Pentru echivalenţii reactivului Schiff vezi tabelul 2. **Observaţii:** se recomandă să se efectueze un control al reacţiei, pe o lamă martor, omiţînd pretratamentul. În felul acesta se verifică şi absenţa aldehidelor libere. Pe preparatele pe care s-a efectuat o reacţie de blocare a grupărilor carbonil (pag. 124) reacţia trebuie să fie negativă.

Prin evidenţierea aldehidelor cu reactivul Schiff aplicat după pretratamente adecvate se pot evidenţia: glucide (mai ales mucopolizaharide neutre), anumiţi aminoacizi, ADN, acetalfosfatide, anumite lipide nesaturate, sfingomielina, glicolipide, pigmenţi lipidici şi proteine conţinînd grupări aminate libere. Toate aceste moduri de aplicare ale reactivului Schiff vor fi prezentate în capitolele respective.

2. COMPLEXELE ALCALINE DE ARGINT

Grupe carbonil primare pot fi evidenţiate cu acest reactiv, datorită puterii lor reducătoare. Reacţia argentafină se aplică, după pretratamentul adecvat, aşa cum s-a descris la pag. 104. Specificitatea reacţiei este mult mai redusă decît în cazul utilizării reactivului Schiff deoarece, în afară de aldehide, numeroşi alţi compuşi au proprietăţi reducătoare. Reacţia este aplicată totuşi mai ales cu scopul vizualizării anumitor glucide şi a polifenolilor.

3. PARAFENILENDIAMINA

Aldehidele formate în urma pretratamentului accelerează viteza de oxidare a p-fenilendiaminei în prezenţa apei oxigenate, reacţie ce duce la conden-

Scanned with OKEN Scanner

sarea a trei molecule de diamină cu formarea unui produs insolubil de culoare albastră-violetă.

Metoda Scarselli. **Reactivi:** 1. sol. apoasă 1% de parafenilendiamină (se conservă la rece și întuneric); 2. apă oxigenată 1,5 vol.; 3. sol. apoasă 1% clorură de aur. **Tehnica:** 1. secțiuni deparafinate și hidratate se supun pretratamentului adecvat; 2. tratare 15 min. la întuneric cu un amestec în părți egale din sol. 1 și 2; 3. spălare repetată cu apă dist.; 4. tratare 5 min. cu sol. 3; 5. spălare cu apă dist., deshidratare, clarificare, montare în balsam sau mediu sintetic. **Rezultat:** structurile ce conțin grupări aldehidice se colorează în albastru-violet închis. **Observații:** după preoxidare cu acid periodic (ca pentru reacția PAS), reacția apare mai intensă și se pare, mai specifică decît după utilizarea reactivului Schiff.

4. FENILHIDRAZINELE

Aceste substanțe, prin condensare în contact cu aldehidele și cetonele, se transformă în fenilhidrazone colorate. Se utilizează, după un pretratament adecvat, la studiul histochimic al lipidelor și glucidelor.

Metoda Albert-Leblond. **Reactivi:** 1. sol. saturată de 2,4-dinitrofenilhidrazină în alcool 30°; se aduce pH-ul la neutralitate cu sol. 0,2 N acetat de sodiu. **Tehnica:** 1. secțiuni deparafinate, hidratate, supuse la pretratament adecvat se lasă timp de 12 ore în sol. 1; 2. spălare cu alcool 17° timp de 20 min.; clătire cu apă dist., deshidratare, clarificare, montare. **Rezultat:** reacția pozitivă se traduce printr-o colorație galbenă. **Observații:** datorită in-

Scanned with OKEN Scanner

tensității relativ slabe a coloraţiei s-a propus cuplarea hidrazonelor cu O-dianizidină diazotată în prezenţa piridinei.

5. HIDRAZIDA ACIDULUI 2-HIDROXI-3-NAFTOIC

Principiul reacţiei este similar cu cel al metodei precedente. Metoda se aplică mai ales ca reacţie nucleală sau în studiul anumitor lipide.

Metoda Ashbel-Seligman. **Reactivi:** 1. hidrazida ac. 2-hidroxi-3-naftoic 0,1 g; alcool 50° 45 ml; acid acetic 5 ml; se face dizolvarea încălzind soluţia la 70°C; 2. sol. tampon Sörensen 0,1 M cu pH 7,2—7,5, 30 ml; alcool absolut 30 ml; diazo-O-dianizidină 50 mg (Fast Blue B); sol. se prepară extemporan. **Tehnica:** 1. secţiuni prin congelare sau după includere în parafină, deparafinate, hidratate; 2. aplicarea pretratamentului corespunzător; 3. tratare 1—3 ore, la 60°C cu sol. 1; 4. spălare în trei băi cu alcool 50° acidulat cu acid acetic în proporţie de 5%, timp de 1 oră; 5. spălare în trei băi cu alcool 50°, apoi timp de o oră cu apă dist.; 6. tratare 2—5 min. cu sol. 2; 7. spălare cu apă dist.; 8. montare în mediu apos, respectiv deshidratare şi clarificare rapidă, montare într-un mediu sintetic. **Rezultat:** reacţia pozitivă se traduce printr-o colorare albastră-purpurie.

6. REACŢII DE BLOCAJ PENTRU ALDEHIDE

Din cauză că unele dintre reacţiile prezentate mai sus nu prezintă o specificitate absolută s-a preconizat controlul lor, utilizînd agenţi chimici care blocînd grupările carbonil le împiedică să intre în com-

Scanned with OKEN Scanner

binație chimică cu reactivii utilizați în reacțiile de identificare. Blocajul se practică după pretratamentul indicat de fiecare metodă; după spălare cu apă, lamele se trec direct în reactivul de identificare al aldehidelor. Se pot utiliza următoarele soluții:

a) **Clorhidrat de anilină:** se adaugă treptat cantitatea de 9 ml anilină la 8 ml HCl conc., agitînd mereu; se diluează apoi cu apă dist. ad 100 ml. Durata tratamentului: 1—6 ore (15 min. pentru reacția Feulgen; 2—4 ore pentru reacția PAS). Blocajul este mai rapid (20—30 min.) dacă se face sol.: anilină 10 ml; acid acetic glacial 90 ml.

b) **Hidroxilamina:** clorhidrat de hidroxilamină 10 g; acetat de sodiu cristalizat 20 g; apă dist. 40 ml. Durata: 1—3 ore.

c) **Thiosemicarbazidă:** thiosemicarbazidă 4 g; acid acetic glacial 2 ml; apă dist. 40 ml. Durata: 2—3 ore la 60°C.

d) **Semicarbazidă:** 2 g clorhidrat de semicarbazidă; 5 g acetat de sodiu cristalizat; 40 ml apă dist. Durata: 2—3 ore la 60°C.

e) **m-Aminofenol:** m-aminofenol 11 g; acid acetic glacial 100 ml. Durata: 1 oră.

f) **Fenilhidrazină:** fenilhidrazină 5 ml; acid acetic glacial 10 ml; apă dist. ad 50 ml. Durata: 2—3 ore (cu clorhidrat de fenilhidrazină durata este de aprox. 1 oră).

g) **Dimedon** (dimetil-5-5′ ciclohexandionă-1,3): sol. 5% dimedon în alcool etilic absolut. Durata: 3 ore la 60°C.

h) **Bisulfit de sodiu:** sol. 0,1 N. Durata: 2—8 ore la temp. laboratorului.

Scanned with OKEN Scanner

H. REACȚII PENTRU FENOLI ȘI NAFTOLI

Ca și în cazul aldehidelor și cetonelor, reacțiile histochimice pentru fenoli au în vedere pe de o parte compușii fenolici liberi, iar pe de altă parte, evidențierea compușilor naftolici, după introducerea artificială a acestora în moleculele anumitor substanțe.

Reacțiile pentru fenoli nu sînt de aplicație generală, ci fiecare dintre ele se utilizează pentru studiul unor grupe mai restrînse de substanțe ca: proteine bogate în tirozină sau triptofan, catecolamine, promelanine etc.

Cu toate că nu se găsește în compușii chimici tisulari, gruparea naftol prezintă o deosebită importanță în tehnica histochimică, deoarece poate fi folosită drept „cromogen". Introdusă artificial în molecula unor substanțe organice va forma un compus în general incolor, care este ulterior evidențiat prin cuplare cu o sare de diazonium, cuplare ce decurge cu formarea unui colorant azoic. Acest tip de reacție este utilizat pentru vizualizarea funcțiilor carbonil, amino- și sulfhidril și mai ales pentru histochimia enzimelor.

În cele ce urmează se vor trata doar problemele generale legate de principalele reacții pentru naftoli și fenoli, modalitățile detaliate de aplicare ale acestor reacții fiind descrise la grupul de substanțe, care le evidențiază.

1. AZOREACȚIA (DIAZOREACȚIA, DIAZONIUM REACTION, AZO COUPLING REACTION)

În principiu, azoreacția constă din cuplarea unei sări de diazonium cu un compus naftoic sau fenolic, într-un mediu alcalin, reacție în urma căreia se

Scanned with OKEN Scanner

formează un colorant azoic. Se produc în prezent un număr mare de săruri de diazonium (tabelul 3), dar acestea nu sînt echivalente sub aspectul intensității, electivității și valorii localizatoare a reacției. Ca regulă generală se va respecta, în măsura posibilităților, indicația dată de fiecare tehnică în parte. Interesează în mare măsură aspectul optic al reacției și în această privință este util de știut că, în general, cu cît molecula sării de diazonium este mai complexă și cu cît greutatea moleculară este mai mare, cu atît produsul reacției este mai intens colorat. Unele dintre aceste săruri au o singură grupare diazonium (monodiazoice), iar altele au două (bis-diazoice). Cu acestea din urmă se obține un produs mai intens colorat, grație posibilității unei duble cuplări, fie spontane, fie provocate. Aspectul particulat sau fin granulat al colorantului azoic depinde nu numai de tipul sării de diazonium, ci și de substratul utilizat, precum și de natura fixatorului.

Sărurile actuale de diazonium sînt stabilizate și se conservă destul de bine, cît timp nu sînt diluate. Există și posibilitatea preparării în laborator a unor săruri de diazonium, dar acestea sînt foarte instabile și trebuie deci preparate chiar în momentul folosirii.

În tabelul 4 sînt prezentate, după L. Lison, substanțele și cantitățile necesare preparării sărurilor respective de diazonium. Amina, de la care se pleacă va fi amestecată cu 50 ml apă dist. apoi se adaugă cantitatea prescrisă de HCl conc.; amestecul se răcește la aprox. 0°C, după care se adaugă, amestecînd mereu, cantitatea prescrisă de nitrit de sodiu

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 3

Sărurile de diazonium cu utilizare curentă în histochimie
(după Lillie și Burstone)

Nr. crt.	Denumirea comercială	Sinonime
1	Fast Black B	Noir solid B, Black BS salt.
2	Fast Black K	—
3	Fast Blue B	Echtblausalz B, Bleu solid B, Bleu BNS, Bleu de dianisidine, Diazo Blue B, Fast Blue BN, Naftanil Blue B
4	Fast Blue BB	Blue BB, 2BS, NBB; Diazo Fast Blue BB; Fast Blue 2B, EB, BBN
5	Fast Blue VB	Blue V,B, VB, NS, NSV; Fast Blue NB, BL; Variamin Blue BD; Variamin Blue B, BD, NB
6	Bordeaux GP	Bordeaux solide GP; Bordeaux Ciba IV; Bordeaux GDN, GPN, GPS, NGP, 3NA
7	Fast Garnet GBC	Echtgranatsalz GBC; Bordeaux II
8	Fast Red B	Echtrotsalz B
9	Fast Red GG	Nitrazol CF; Fast Red 2G, 2 J; Red GG, 2GS; Nitrosamine Red; Paranitraniline Red.
10	Fast Red GL	Echtrotsalz 6 GL; Diazo Fast Red GL; Diazo Red G; Fast Red G;YL, 3NT; Red G, GL, VII
11	Fast Red L/TR	Echtratsalz ITR; Fast Red ITRN; Red ITR; Fast Brentamine L/TR salt
12	Fast Red RC	Echtratsalz RC, Brown C, III; Dia-Red RC; Fast Red 4 CA, RCN, RS; Red RC, RCS

Scanned with OKEN Scanner

Denumirea chimică	Viteza de cuplare	Stabilitatea soluției
p,p-diaminodifenilamină	Lentă	Redusă
4-amino-4'-nitro-3-6-dimetoxi-azobenzen	Lentă	Redusă
O-diaminizidină	F. lentă	Mare
4-amino-2'5'-dietoxibenzanilidă	Lentă	Mare
N-p-metoxifenil-p-fenilendiamină	F. lentă	Mare
2-nitro-p-anisidină	Rapidă	Bună
4-amino-3 : 1'-dimetilazo-benzen	F. rapidă	Bună
5-nitro-O-anisidină	F. rapidă	F. mare
p-nitroanilină	F. rapidă	Mare
3-nitro-p-toluidină	Rapidă	Bună
N,N-dietil-4-metoximetanilamidă	Destul de rapidă	Mare
4-cloro-O-anisidină	Rapidă	F. mare

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 3 (continuare)

Nr. crt.	Denumirea comercială	Sinonime
13	Fast Red RL	Fast Red NRL, 5 NT; Red RL; Ponceau solide L; Ponceau naphtosol solide L
14	Fast Red TR	Echtratsalz TR; Diazo Fast Red TR; Fast Red 5 CT, TRN; Red salt IX; Red TA, TR, TRS
15	Fast Scarlet GG	Fast Scarlet GGS, GGN, 2J, DS; Scarlet A, GG, 2G, I; Diazo Fast Scarlet GG
16	Fast Scarlet R	Fast Scatlet 4NA, RC, RN; Diazo Fast Scarlet R; Brown Salt D, IV; Scarlet NSR, R, RB, RC, RS, III
17	Fast Violet B	Diazo Fast Violet B; Fast violet BN; Violet B, BN.

sol. 5%, răcită și ea la 0°C; reactivul se lasă încă 15 min. la rece, apoi poate fi utilizat; sub această formă se conservă 24—48 ore.

Tabelul 4

Prepararea extemporană a unor săruri de diazonium (după M. G a b e)

Amina ce se diazetează	Amină (g)	Cantit. de ClM (ml)	Sol. de nitrit de sodiu (ml)
Acid sulfanilic	0,20	4	3
Metafenilen-diamină	0,20	8	6
Naftilamină	0,15	4	2
Acid naftionic	0,15	4	2
Benzidină	0,20	8	5
O-dianisină	0,15	8	5
Acid benzidin-disulfonic	0,25	8	5
Acid dianisin-sulfonic	0,12	8	5

Scanned with OKEN Scanner

Denumirea chimică	Viteza de cuplare	Stabilitatea soluției
3-nitro-O-toluidină	F. rapidă	Mare
5-cloro-O-toluidină	Rapidă	F. mare
2,5-dicloroanilină	F. rapidă	F. mare
4-nitro-O-anisidină	F. rapidă	Bună
2-benzoilamino-4-metoxitoluidină	Lentă	Mare

PROCEDEUL LILLIE PENTRU DIAZO-SAFRANINĂ O: se prepară la rece (+4°C) două soluții: a) 3,6 g safranină O; apă dist. 60 ml; HCl normal 30 ml; b) sol. apoasă 6,9% nitrit de sodiu; pentru lucru se amestecă 4,5 ml sol. (a) cu 0,5 ml sol. (b); amestecul se lasă 15 min. la 0°C, după care se diluează de 40 ori cu tamponul indicat și se folosește imediat.

PROCEDEUL LILLIE-GLENNER PENTRU DIAZO-ACID S. Se pleacă de la 240 mg acid S (acid S-amino-1-naftol-5 sulfonic) dizolvat în 6 ml apă dist.; se adaugă 3 ml HCl normal și se răcește la +4°C, după care se adaugă 1 ml sol. apoasă 6,9% nitrit de sodiu; se mai lasă soluția la rece încă 15 min.

PROCEDEUL DAVIS PENTRU DIAZO-PARAROZANILINĂ. Sol A: 1 g clorhidrat de pararozanilină (fucsină bazică) în 25 ml HCl 2N; soluția B: nitrit de sodiu 1 g;

apă dist. 25 ml; se amestecă într-o eprubetă mică 4 picături din sol. A cu 4 picături din sol. B; se agită 30 sec.; se alcalinizează cu 0,6 ml sol. N de hidroxid de sodiu și se utilizează imediat. Întregul procedeu se face la temp. laboratorului.

Sărurile stabile de diazonium dau rezultate mai bune în reacțiile de evidențiere ale naftolilor introduși artificial în anumite molecule, pe cînd cele preparate extemporan dau rezultate mai bune în evidențierea compușilor fenolici naturali. Sărurile stabile din comerț se recomandă, atunci cînd se utilizează în histochimia enzimelor, să fie debarasate de metalele incluse ca stabilizatori. Acest lucru se poate realiza amestecînd sol. de sare de diazonium cu o rășină schimbătoare de ioni și cationi.

Pentru reacția de cuplare, sarea de diazonium stabilă se dizolvă cu o sol. tampon la pH-ul indicat de tehnica utilizată (în general pH 7—8,5). Sărurile preparate extemporan se diluează cu tampon sau se alcalinizează cu o sol. rece de carbonat de sodiu.

După alcalinizare, soluțiile sînt instabile (se conservă aprox. 15 min.), așa încît nu se va pregăti decît cantitatea strict necesară, iar cînd cuplarea prescrisă depășește 5 min. este bine să se facă la +4°C. În tabelul 3 este prezentată viteza de cuplare a principalelor săruri de diazonium, stabilitatea soluției și culoarea compusului azoic.

Coloranții azoici rezultați prin cuplare sînt cel mai adesea solubili în alcool sau în benzen, așa încît montarea trebuie făcută în medii apoase. Sînt și cazuri compatibile cu montarea în balsam sau medii sintetice.

În privința specificității azoreacției s-a stabilit de către L. Lison că ea identifică toți fenolii, cu condiția ca hidroxidul fenolic să fie liber și cel puțin

Scanned with OKEN Scanner

una din poziţiile o r t o sau p a r a în raport cu hidroxidul fenolic să fie de asemenea liberă. Mai produc azoreacţia grupele indol şi imidazol (prezente în histidină).

2. REACŢIA ARGENTAFINĂ

Această reacţie nu are specificitatea şi siguranţa azoreacţiei, deoarece ea este dată de prezenţa în ţesuturi a unor compuşi reducători. Aşa cum s-a arătat în capitolul precedent, aceştia pot să fie aldehide induse printr-un pretratament adecvat. Dintre fenoli prezintă o capacitate reducătoare suficientă polifenolii, aminofenolii şi poliaminele în poziţia orto şi para. Reacţia are totuşi o valoare informativă importantă, deoarece majoritatea compuşilor reducători naturali din ţesuturile animale este reprezentată de către fenoli. Reacţia se desfăşoară aşa cum s-a indicat la pag. 104.

3. REACŢIA CROMAFINĂ (FEOCROMĂ)

În urma utilizării sărurilor de crom ca fixatori chimici s-a constatat că anumite ţesuturi au o afinitate deosebită pentru crom, colorîndu-se în galben sau cafeniu, din care cauză reacţia s-a numit „cromafină". Colorarea specifică nu se datorează depunerii elective a compuşilor cromici în anumite celule, dovadă este faptul că reacţia de colorare se obţine şi cu iodat de potasiu. Cînd s-a descoperit adrenalina şi nor-adrenalina s-a constatat că aceste substanţe produc reacţia cromafină „in vitro", aşa că s-a considerat reacţia obţinută pe secţiuni de suprarenală ca fiind datorată lor. În prezent se ştie că toate substanţele care reacţionează cu sărurile de crom la fel ca adrenalina şi nor-adrenalina sînt

Scanned with OKEN Scanner

polifenoli, aminofenoli sau poliamine în poziţie orto sau para. Prin oxidare, acestea vor da naştere la chinone sau chinone-imine, care în continuare se vor cicliza şi condensa formînd un compus insolubil, colorat, de tipul melaninelor. **Tehnica:** reacţia se poate practica pe probe de ţesuturi sau pe secţiuni. În primul caz se face fixarea cu un amestec pe bază de bicromat de potasiu (fără acizi şi metale grele), ca de exemplu: Regaud, Kopsch, Orth. Fixarea se continuă cu o cromizare timp de 5 zile în sol. apoasă 3% bicromat de potasiu. Urmează o spălare de 24 ore cu apă curgătoare şi includere uzuală în parafină. Secţiunile deparafinate pot fi montate în balsam ca atare sau se efectuează în prealabil o coloraţie de fond sau diferite reacţii histochimice. Reacţia feocromă se poate produce şi cu iodat de potasiu: fixare sol. 5% iodat de potasiu în formol 10%, urmată de un tratament cu sol. apoasă 5% iodat de potasiu timp de 3 zile; spălare şi includere ca mai sus.

Reacţia cromafină pe secţiuni se practică după fixarea în amestecuri pe bază de bicromat (sau alţi fixatori atunci cînd nu evidenţiem adrenalina), urmată de cromizare (sol. 3%) pe secţiuni timp de 3—4 ore şi spălare completă a bicromatului cu apă curgătoare. Atunci cînd fixarea se face cu glutaraldehidă, aceasta va insolubiliza aminele primare (hidroxitiramina şi noradrenalina), dar nu şi pe cele secundare (adrenalina); ulterior, practicînd reacţia cromafină se vor evidenţia doar cele dintîi.

Reacţia cromafină poate fi considerată suficient de specifică pentru substanţele amintite, deoarece coloraţia se datorează înseşi substanţelor ce reacţionează cu reactivul, în plus, prin pretratamente adecvate, specificitatea ei poate fi restrînsă şi mai mult.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL V

EVIDENȚIEREA HISTOCHIMICĂ A AMINOACIZILOR ȘI PROTIDELOR

În această categorie importantă de substanțe se vor studia aminoacizii, peptidele, holoproteidele sau proteinele și heteroproteidele.

Ca metodologie se recurge la două grupe de metode:

a) metode fizico-chimice: studiul caracterului electropolar, studiul solubilității diferențiale, metode de identificare prin digestie enzimatică, metode imuno-histochimice și autohistoradiografice;

b) metode bazate pe reacții histochimice cuprinzînd reacții generale (pentru proteinele totale), reacții de grup (care nu caracterizează întreaga moleculă proteică, ci doar un anumit număr de grupări reactive), reacții pentru grupări particulare (tirozină, triptofan, arginină etc.), precum și reacții de identificare prin blocaj specific.

Preparatele făcute pentru studiul histochimic al proteinelor nu ridică problema existenței acestor substanțe în țesuturi, căci practic nu există structuri celulare sau tisulare lipsite de proteine. Se pune în schimb problema prezenței unor aminoacizi sau proteine în cantitate mai mare sau mai mică

Scanned with OKEN Scanner

la nivelul diferitelor structuri. Acest aspect este condiționat în foarte mare măsură de pretratamentul probelor și în special de modalitatea de fixare utilizată.

Un fixator ideal pentru proteine, adică unul care să conserve intactă structura, compoziția chimică și toate grupările reactive, nu există. Imperativul major al fixării morfologice, adică păstrarea edificiului proteic macromolecular, este realizabil cu un număr destul de mare de fixatori chimici uzuali. Imperativul fixării histochimice, adică păstrarea majorității grupelor reactive, pentru ca acestea să fie ulterior accesibile diferiților reactivi de identificare, este realizat de un număr restrîns de fixatori și de către aceștia doar în mod parțial. Se impune deci cunoașterea modificărilor chimice cauzate de fiecare agent fixator și alegerea acestuia corelată cu scopul și natura reacției ce urmează să se efectueze.

Efectul agenților fixatori uzuali asupra proteinelor a fost prezentat în capitolul respectiv (pag. 21). Rezultă de acolo că formolul este un fixator foarte convenabil căci, după spălare cu apă, majoritatea grupărilor reactive rămîn accesibile reacției (mai puțin grupările aminate și nucleii aromatici). Pentru triptofan, fixarea nu va depăși 2 zile, căci altfel se ajunge la formarea unor produși de condensare insolubili. Alcoolul etilic și acetona sînt, de asemenea, buni fixatori pentru proteine, dar conservă mai slab morfologia țesuturilor. Amestecurile pe bază de sublimat permit reacții pentru evidențierea majorității grupărilor reactive, cu excepția grupării sulfhidril. Amestecurile pe bază de acid osmic sau cele cu săruri de crom au utilizări foarte restrînse,

Scanned with OKEN Scanner

căci blochează ireversibil majoritatea grupărilor reactive.

Procedeul de congelare-deshidratare, prin faptul că păstrează proteinele aproape în stare nativă, rămîne procedeul ideal. Rezultate aproape la fel de bune se obţin şi prin procedeul de congelare-substituţie (cu alcool).

A. REACŢII GENERALE PENTRU EVIDENŢIEREA PROTEINELOR CA ATARE

Se utilizează în acest scop mai ales reacţia biuretului (specifică pentru gruparea peptidică) şi reacţii pentru gruparea carboxil-alfa-acilamină (caracteristică pentru grupările terminale ale lanţurilor moleculare polipeptidice).

a) Reacţia biuretului (metoda Sols). **Principiu:** în prezenţa hidroxidului de sodiu şi a sulfatului de cupru, polipeptidele se colorează în violet, fapt datorat prezenţei grupărilor peptidice (-CO-NH-). **Reactivi:** 1. sol. apoasă 5% sulfat de cupru cristalizat 80 ml; glicerină 2 ml; sol. apoasă 20% NaOH 400 ml; apă dist. ad 1000 ml. **Tehnica:** 1. fixare cu formol sau alcool, includere în parafină; 2. secţiuni hidratate se tratează la temp. laboratorului timp de 10 min. cu sol. 1; 3. clătire cu apă dist., deshidratare, clarificare, montare. **Rezultat:** proteinele se colorează în albastru-violet.

b) Reacţia Barrnett-Seligman pentru grupe carboxilice **Principiu:** anhidrida acetică în prezenţa piridinei reacţionează cu grupările carboxilice terminale, care după tratamentul cu hidrazida-2 hidroxi-3-naftoică se transformă în hidrazone (grupele terminale) sau dihidrazide (grupele laterale); vizua-

Scanned with OKEN Scanner

lizarea produsului reacţiei se face prin cuplare cu o sare de diazoniu, rezultînd un compus azoic colorat. **Reactivi:** 1. amestec în părţi egale de anhidridă acetică şi piridină anhidră (redistilată pe oxid de bariu); 2. se dizolvă la cald 50 mg hidrazida acidului hidroxi-2 naftoic-3 în 2,5 ml acid acetic glacial, după care se adaugă 47,5 ml alcool etilic 50°; 3. sol. apoasă 1% bicromat de sodiu; 4. sol. 0,5 N de acid clorhidric; 5. amestec în părţi egale de alcool etilic absolut şi tampon de fosfaţi Sörensen 0,06 M cu pH 7,6; în acesta se dizolvă prin agitare 5 mg diazo-O-dianizidină (Fast Blue B). **Tehnica:** 1. fixare de preferinţă cu sublimat (Susa) sau formol, formol-alcool, includere în parafină; 2. secţiuni deparafinate, hidratate se tratează 1 oră, 60°C cu sol. 1; 2. spălare cu alcool absolut, 96°, 70°, 50°; 3. tratare timp de 2 ore la temp. laboratorului cu sol. 2; 4. spălare în 3 băi, a 10 min. fiecare, cu alcool 50°; 5. tratare 30 min. cu sol. 4; 6. clătire cu apă dist.; 7. tratare în 3 băi cu sol. 3; 8. clătire repetată cu apă dist.; 9. tratare 2—5 min. cu sol. 5; 10. spălare repetată cu apă dist.; 11. montare în glicerogel (sau alt mediu apos) sau deshidratare, clarificare rapidă şi montare într-un mediu sintetic. **Rezultat:** în funcţie de abundenţa lor, grupările carboxilice terminale se colorează în roşu (monocuplare) sau în albastru (bicuplare).

c) Metoda Geyer cu hidorxilamină. **Principiu:** prin tratare cu anhidridă acetică şi piridină, grupările carboxilice reactive sînt activate iar apoi, cu ajutorul hidroxilaminei, sînt transformate în acizi hidroxaminici; aceştia sînt apoi vizualizaţi prin formarea unui complex metalic cu săruri ferice. **Reactivi:** 1. amestec 3 : 1 de anhidridă acetică şi piridină; 2. sol. apoasă 3,75% clorhidrat de hidroxila-

Scanned with OKEN Scanner

mină 10 ml; sol. 0,1 N hidroxid de sodiu 6 ml; 3. acid percloric 70% 7 ml; alcool absolut (rece) ad 100 ml; 4. $FeCl_3$ $6H_2O$ 1,63 g, acid clorhidric conc. 5 ml; acid percloric 70% 5 ml; soluția se evaporează în etuvă apoi se diluează cu 100 ml apă dist. Această soluție mamă de feriperclorat se conservă 4 săptămîni (în frigider); cu sol. mamă se prepară sol. 5: acid percloric 70% 1,7 ml; sol. mamă de feriperclorat 12 ml. Se răcește, apoi se aduce la 100 ml cu alcool absolut. **Tehnica:** 1. fixare cu formol, Carnoy sau Bouin; 2. secțiuni deparafinate se usucă în etuvă la 37°C apoi se tratează 6—12 ore la 56°C cu sol. 1; 3. spălare cu alcool absolut, schimbat de cîteva ori, timp de 3—4 min.; 4. hidratare gradată cu alcool 95°, 70°, apă dist.; 5. tratare cu sol. 2 timp de 10 min.; 6. deshidratare treptată cu alcool 70°, 96°, apoi tratare 5 min. cu sol. 3 la +4°C; 7. tratare 5 min. cu sol. 4; 8. deshidratare rapidă cu alcool absolut, clarificare cu xilol, montare în balsam. **Rezultat:** grupările carboxilice reactive se colorează în brun-roșietic.

B. REACȚII PENTRU GRUPĂRI AMINATE LIBERE

Deoarece grupări aminate pot fi întîlnite și în anumite lipide, iar specificitatea reacțiilor pentru grupările aminate ale proteinelor nu este absolută, este bine ca în cadrul lucrărilor de precizie să se efectueze un control prin extracția lipidelor și un altul prin blocarea specifică a grupelor aminate.

a) Metoda Yasuma-Ichikawa (ninhidrină-Schiff). **Principiu:** reactivi ca aloxanul sau ninhidrina reacționează cu grupările aminate libere ale proteinelor cu formare de aldehide care ulterior sînt vizualizate

Scanned with OKEN Scanner

cu ajutorul reactivului Schiff. **Reactivi:** 1. sol. 0,5% ninhidrină în alcool absolut (se poate înlocui cu sol. 1% aloxan); 2. reactiv Schiff (pag. 119); 3. apă sulfuroasă (pag. 121). **Tehnica:** fixare cu alcool etilic 85°; alcool 85° cu 5% acid acetic sau Carnoy, includere în parafină sau secţionare la criotom; 2. secţiuni deparafinate, hidratate se tratează 16—20 ore, la 37°C cu sol. 1; 3. spălare 5 min. cu apă curgătoare; 4. tratare cu reactivul Schiff 15—25 min.; 5. tratare 3×2 min. cu apă sulfuroasă; 6. clătire cu apă dist.; 7. coloraţie nucleară (facultativ) cu hematoxilină Groat sau Mayer urmată de spălare cu apă curgătoare 5 min. apoi de diferenţiere cu alcool acidulat cu HCl (1%); 8. deshidratare cu alcool, clarificare cu xilol, montare în medii sintetice sau balsam. **Rezultat:** reacţia pozitivă se traduce printr-o coloraţie roz sau roşie, în funcţie de abundenţa grupărilor aminate primare. **Observaţii:** soluţiile de ninhidrină sau aloxan se prepară extemporan şi se utilizează o singură dată; aloxanul este corespunzător doar dacă pulberea este albă.

b) Metoda Burstone (cloramină T. Schiff). **Principiu:** ca pentru reacţia precedentă. **Reactivi:** 1. sol. 1% cloramină T în tampon de fosfaţi pH 7,5 (se poate înlocui cu o soluţie de 10% hipoclorit de sodiu); 2. sol. apoasă 5% tiosulfat de sodiu; 3. reactivul Schiff (pag. 119); 4. apă sulfuroasă (pag. 121). **Tehnica:** 1. fixare cu Carnoy, acetonă rece, includere în parafină; 2. tratare timp de 6 ore la 37°C cu sol. 1; 3. clătire rapidă cu apă dist.; 4. tratare 3 min. cu sol. 2; 5. clătire cu apă dist.; 6. tratare cu reactiv Schiff 20—30 min.; 7. spălare 3×2 min. cu apă sulfuroasă (acid sulfuros); 8. clătire cu apă dist.; 9. deshidratare, clarificare, montare în mediu

Scanned with OKEN Scanner

sintetic. **Rezultat:** prezența grupărilor aminate este evidențiată de o coloraţie roz sau roşie.

c) Metoda Dixon (OTA). **Principiu:** acidul tanic se combină cu grupările aminate ale proteinelor, iar produsul de condensare rezultat este oxidat cu acid periodic şi transformat într-un compus de tip ortochinonic; acesta este apoi vizualizat prin cuplare cu o sare de diazonium. **Reactivi:** 1. se dizolvă 10 g acid tanic în puţină apă dist.; se adaugă 25 ml. sol. N de HCl apoi se aduce cu apă dist. la 250 ml; 2. sol. apoasă 0,5% acid periodic; 3. 100 mg Fast Blue B salt dizolvat în 82 ml sol. 0,2 M tampon de acid acetic-acetat de sodiu, pH 4,0; înainte de dizolvare se răceşte tamponul la +4°C. **Tehnica:** 1. probe tratate prin congelare-deshidratare sau fixate în Carnoy, formol, includere în parafină; 2. secţiuni hidratate se tratează 10 min. cu sol. 1; 3. spălare în 3 băi de apă dist.; 4. se tratează secţiunile pe stativ, timp de 5 min., cu sol. 2; secţiunile se colorează în cafeniu deschis; 5. spălare de trei ori cu apă dist.; 6. spălare cu apă dist. răcită la +4°C; 7. tratare timp de 20 min. în frigider la +4°C, cu sol. 3; 8. spălare cu apă curentă, deshidratare cu alcool, clarificare cu xilol, montare într-un mediu sintetic. **Rezultat:** grupele aminate din proteine sînt indicate de o coloraţie roz-roşie. **Observaţii:** secţiuni de control se pot obţine omiţînd timpii de la punctele 4 şi 5. Vizualizarea produsului reacţiei se poate face şi cu o sol. apoasă 10% de clorură ferică ce se aplică după punctul 5 şi este urmată de spălare cu apă dist., deshidratare etc.

d) Reacţii de blocaj pentru grupele aminate primare. Aceste reacţii suprimă reactivitatea grupelor aminate primare, astfel că aplicarea ulterioară a metodelor descrise mai sus va duce la rezultate ne-

Scanned with OKEN Scanner

gative. Se pot utiliza în acest scop următoarele procedee:

1. **Acetilarea reversibilă. Principiu:** anhidrida acetică, în prezența piridinei, transformă grupele aminate în N-acetilamine. Reacția este reversibilă după hidroliza cu hidroxid de potasiu. **Tehnica:** 1. secțiuni deparafinate se trec prin alcool 96° și absolut după care se tratează cu piridină pură; 2. tratament timp de 4—24 ore la 25—60°C cu o soluție 40% anhidridă acetică în piridină; 3. clătire cu piridină pură; 4. clătire în alcool absolut, 96°, 70° și apoi cu apă dist., după care se poate trece la efectuarea unei reacții pentru evidențierea grupărilor aminate.

Hidroliza se poate practica după hidratarea secțiunilor (după punctul 4), tratîndu-le cu o sol. 1% KOH în alcool 70°; spălare cu alcool 70°, apă dist. și efectuarea unei reacții pentru grupele aminate. Pe secțiunile tratate astfel se restabilește reactivitatea acestor grupe.

Lillie recomandă următorul procedeu de acetilare: 1. secțiuni deparafinate și hidratate se clătesc rapid cu acid acetic glacial, apoi se tratează 3—5 min. cu amestecul: anhidridă acetică 10 ml; acid acetic glacial 30 ml; acid sulfuric conc. 0,1 ml; 2. spălare 10 min. cu apă curentă, după care se trece la efectuarea unei reacții pentru grupele aminate.

2. **Dezaminarea. Principiu:** acidul nitros acționînd asupra grupelor aminate primare va determina o reacție cu formare de alcool și eliminarea de azot, grupele aminate fiind inactivate. **Reactivi:** 1. se amestecă în părți egale o sol. apoasă 5% nitrit de sodiu cu o sol. 10% acid acetic glacial; 2. se poate utiliza și un amestec în părți egale de sol. 8%

Scanned with OKEN Scanner

nitrit de sodiu cu o sol. 6 N de acid clorhidric. **Tehnica:** 1. secţiuni deparafinate, hidratate se tratează la temp. de +4°C timp de 18—48 ore în sol. 1 sau 2; 2. clătire cu apă dist. apoi efectuarea unei reacţii pentru grupele aminate. **Observaţii:** reacţiile de blocaj de mai sus se aplică şi în cazul utilizării metodelor cu 2.4-dinitrofluorobenzen pentru grupele fenol ale tirozinei şi pentru grupele imidazol.

C. REACŢII PENTRU EVIDENŢIEREA UNOR AMINOACIZI

Menirea acestor reacţii este, în ultimă instanţă, studiul proteinelor, deoarece acestea prezintă în multe cazuri diferenţe însemnate în privinţa compoziţiei în aminoacizi, fapt ce permite uneori identificarea şi localizarea lor. Reacţiile din această grupă caracterizează radicali sau grupări ale unor aminoacizi, cu condiţia ca grupările respective să fie libere, adică să aparţină unor aminoacizi terminali sau laterali ai moleculelor proteice. Există în prezent reacţii suficient de specifice, care permit evidenţierea grupării fenol a tirozinei, grupării indol a triptofanului, grupării guanidil a argininei, grupărilor -SS- şi -SH ale proteinelor sulfhidrilate etc.

1. EVIDENŢIEREA RADICALULUI GUANIDIL ŞI A ARGININEI

Arginina este abundentă mai ales la nivelul protaminelor şi histonelor, componente principale ale nucleului, caracterizate şi prin puternica lor bazofilie. Majoritatea reacţiilor histochimice pentru caracterizarea argininei se bazează pe reacţia lui Sakaguchi, aplicată în mai multe variante:

Scanned with OKEN Scanner

Metoda Sakaguchi, varianta Baker. **Principiu:** Alfa naftolul şi hipocloritul de sodiu, în mediu alcalin, reacţionează cu grupul guanidil al argininei, dînd naştere unui produs colorat (o chinonă-imină). **Reactivi:** 1. sol. 1% NaOH 2 ml; sol. 1% alfa-naftol în alcool 70°, 2 picături; sol. de hipoclorit de sodiu (d: 1,05) 4 picături; 2. amestec în părţi egale de cloroform-piridină. **Tehnică:** 1. fixare cu formol, alcool, Carnoy, Zenker, Susa sau Bouin şi includere în parafină; 2. secţiunile deparafinate se colodinează în strat subţire, apoi se hidratează; 3. se lasă să se usuce parţial, apoi, se tratează 15 min. cu sol. 1; 4. se scurge reactivul, se sugativează secţiunea, apoi se menţine 3 min. în sol. 2; 5. montare în sol. 2 sau în piridină pură şi examen imediat, căci se decolorează destul de rapid. **Rezultat:** prezenţa argininei este indicată de o coloraţie roşie-oranj.

2. EVIDENŢIEREA TIROZINEI

Toate metodele din această grupă sînt bazate pe acţiunea acidului azotic sau azotos asupra nucleului fenolic al tirozinei şi formarea unui nitrosofenol. Acesta este vizualizat ulterior, fie prin formarea unor complexe metalice colorate, fie transformîndu-l într-un nitrat de diazonium, care la rîndul lui este cuplat cu un naftol, formînd astfel un complex colorat.

a) Metoda Pollister-Ris. **Reactivi:** 1. sol. 3,6 N acid tricloracetic 10 ml; apă dist. 10 ml; acetat mercuric 1 g; la folosire se adaugă 2 ml sol. 1% nitrit de sodiu şi se depune în etuvă la 30°C; după 25 min. se poate utiliza; 2. sol. 10% acid sulfuric 100 ml; sulfat mercuric 10 g; la folosire se diluează cu apă dist. în proporţie de 1 : 1 apoi se adaugă cîte

Scanned with OKEN Scanner

1 ml. sol. 1% nitrit de sodiu pentru fiecare 20 ml de reactiv, se lasă 25 min. în etuvă la 30°C după care se poate folosi. **Tehnica:** 1. fixare cu formol, alcool, Carnoy, congelare-deshidratare și includere în parafină; la secționare se vor etala cîte două secțiuni învecinate din fiecare probă; 2. deparafinare, colodinare, hidratare, sugativare cu hîrtie de filtru; 3. jumătate din secțiuni se tratează 5 min. la 30°C cu sol. 1; 4. sugativare și spălare 3×5 min. cu alcool 70°; 5. deshidratare, clarificare, montare în mediu sintetic; 6. restul lamelor se prelucrează ca mai sus la punctul 2, apoi se tratează 5 min. la 30°C cu sol. 2; spălare 10 min. cu apă curentă, deshidratare, clarificare, montare. **Rezultat:** reacția pozitivă este semnalată de o colorație oranj-roșie; pe secțiunile tratate cu sol. 1 se evidențiază tirozina totală iar pe cele tratate cu sol. 2, care a produs și extracția histonelor, se evidențiază tirozina din alte proteine decît histonele.

b) Tetrazoreacția lui Danielli. **Principiu:** reactivul Fast Blue B salt conține două grupări diazonium dintre care una reacționează cu grupările fenol, iar cealaltă va fi ulterior cuplată cu un naftol, acidul H (acid 8-amino-1-naftol-3,6-disulfonic) sau acidul S (acid 8-amino-1-naftol-5 sulfonic) formîndu-se un colorant azoic mai intens colorat și puțin solubil în alcool. **Reactivi:** 1. se prepară extemporan o sol. din 0,05 g Fast Blue B salt în 50 ml tampon Michaelis de acetat veronal cu pH 9,2 răcit în prealabil la +4°C; 2. 50 ml tampon Michaelis ca mai sus, în care se dizolvă 1 g din acidul H sau S. **Tehnica:** 1. fixare cu alcool sau Carnoy, includere în parafină; 2. secțiuni deparafinate, colodinate, hidratate se tratează 15 min. la +4°C cu sol. 1; 3. spălare în două băi cu tampon Michaelis pH 9,2

Scanned with OKEN Scanner

răcit la +4°C; 4. tratare 15 min. tot la rece, cu sol. 2; 5. spălare 5 min. cu apă curentă, deshidratare rapidă cu alcool sau acetonă, clarificare cu xilol, montare în mediu sintetic sau balsam. **Rezultat:** reacţia pozitivă se traduce printr-o coloraţie galbenă sau purpurie. **Observaţii:** reactivul Fast Blue B-salt poate fi înlocuit cu o sare diazoică de benzidină preparată extemporan: se dizolvă 18 mg benzidină în 50 ml apă dist.; se adaugă 0,83 ml acid clorhidric conc.; se răceşte la +4°C, apoi se adaugă 1 ml sol. apoasă 1,4% nitrit de sodiu; se agită timp de 10 min. apoi se aduce pH-ul la 9,6 cu o sol. apoasă 10% NaOH. În locul acidului H se poate prepara sol. 2 cu aceeaşi cantitate de β-naftol. Tehnica decurge la fel, cu deosebirea că după spălarea cu apă de la punctul 5 se face montarea în sirop Apathy. Rezultatul diferă sub aspectul coloraţiei care este roşie-cafenie.

Reacţia practicată în variantele de mai sus este mai curînd o reacţie generală pentru proteine, căci alături de tirozină reacţionează şi triptofanul, histidina, purinele şi pirimidinele din nucleu. Pentru limitarea la studiul tirozinei se impun unele reacţii de control: a) suprimarea reactivităţii tirozinei cu dinitrofluorobenzen (tratare 16—20 ore cu sol.: alcool absolut 100 ml; 2,4-dinitrofluorobenzen 1 g; sol. N/1 NaOH 0,2 ml); urmează spălare 4×3 min. cu alcool 96° după care se practică reacţia; se evidenţiază doar triptofanul şi histidina; b) suprimarea reactivităţii triptofanului prin oxidare cu acid periodic; c) benzoilarea (secţiunile deparafinate cu xilol şi alcool absolut se trec pentru 10—16 ore într-o sol. 10% clorură de benzoil în piridină anhidră), nu lasă să persiste decît reactivitatea tirozinei.

Scanned with OKEN Scanner

c) Metoda Glenner-Lillie este considerată ca fiind cea mai bună pentru evidențierea tirozinei. **Principiu:** prin acțiunea acidului nitros, la rece și întuneric, se produce diazotarea tirozinei, iar sarea de diazonium rezultată se vizualizează prin cuplare cu acidul H (sau S). **Reactivi:** 1. apă dist. 28 ml; nitrit de sodiu 2 g; acid acetic cristalizabil 1,7 ml; 2. 50 ml alcool 70°; acid H (sau acid S, 1-amino-O-naftol-3,6-disulfonic) 0,5 g; hidroxid de potasiu 0,5 g; uree 1 g (se poate înlocui cu 0,5 g sulfamat de amoniu); 3. sol. HCl 0,1 N 200 ml. **Tehnica:** 1. fixare cu alcool, Carnoy, formol, includere în parafină; 2. secțiuni deparafinate, hidratate, colodinate, se tratează 16 ore la +4°C și întuneric cu sol. 3. spălare 4×5 sec. în apă dist. rece; 4. tratare 1 oră, la +4°C și întuneric cu sol. 2; 5. spălare 3×5 min. cu sol. 3; 6. spălare 10 min. cu apă curentă; 7. deshidratare cu alcool, clarificare cu xilol, montare în mediu sintetic sau balsam. **Rezultat:** prezența tirozinei este semnalată de o colorație roz sau roșie (în funcție de abundența tirozinei).

3. REACȚII PENTRU EVIDENȚIEREA TRIPTOFANULUI

Reacțiile pentru triptofan sînt considerate drept cele mai sensibile și mai specifice din grupul reacțiilor pentru proteine. Evidențierea triptofanului prezintă un interes deosebit, atît în histologia normală, cît și în cea patologică, dat fiind faptul că numeroase structuri sau produși elaborați de celule se caracterizează printr-un conținut ridicat în triptofan: celulele principale din glandele fundice gastrice (pepsina), granulele de secreție din celulele pancreasului exocrin (tripsina, chimotripsina), celulele A din pancreasul endocrin (glucagon), coloidul tiroidian

Scanned with OKEN Scanner

(tiroglobulina), unele celule din antehipofiză (gonadotropine), granulele celulelor Paneth, proteinele serice (gamaglobuline și fibrinogen), fibrinoidul, neurocheratina ș.a. Colagenul normal este lipsit de triptofan.

Fixarea recomandată în general pentru aceste reacții este cea cu formol, cu condiția să nu fie prelungită peste 10 ore. Se mai recomandă alcoolul etilic conținînd 1% acid tricloracetic sau alcoolul metilic de 70°. Probele fixate în amestecuri cu sublimat se pretează la aceste reacții doar după un pretratament al secțiunilor timp de 10 min. la 37°C cu o sol. 10% tiosulfat de sodiu, iar cele fixate în amestecuri pe bază de acid picric, după tratare 10 min. la temp. laboratorului cu o sol. saturată de carbonat de litiu în alcool 70°. Fixatorii care conțin crom sînt contraindicați.

a) METODA ADAMS („DMAB-NITRIT"). **Principiu:** nucleul indol al triptofanului formează cu dimetilaminobenzaldehida DMAB o β-carbolină care prin oxidare cu nitrit de sodiu formează un produs colorat în albastru. **Reactivi:** 1. se dizolvă la cald 2 g gelatină în sol. apoasă 0,5% alaun de crom; 2. sol. 5% DMAB în HCl conc.; 3. sol. 1% nitrit de sodiu în HCl conc.; 4. sol. 1% HCl în alcool 70°. **Tehnica:** 1. probe fixate în formol cel mult 24 ore; se mai poate utiliza sol. 1% acid tricloracetic în alcool etilic, alcool metilic 70°, sau sol. apoasă 10% ac. sulfosalicilic. De asemenea, secțiuni la criotom uscate apoi pe lamă; 2. secțiunile se lipesc pe lamă cu gelatină cromată (sol. 1) după care se usucă în etuvă la 37°C timp de 3—4 zile; 3. deparafinare cu xilol, apoi alcool absolut și colodinare în strat subțire; 4. tratare timp de 1 min. cu sol. 2; 5. tratare 1 min. cu sol. 3; 6. spălare cu apă distil. 30 sec.; 7. clătire

Scanned with OKEN Scanner

cu sol. 4; 8. deshidratare, clarificare, montare în mediu sintetic. **Rezultat:** proteinele ce conţin triptofan se colorează în diferite intensităţi de albastru.

b) METODA GLENNER-LILLIE („BENZILIDEN-POST CUPLARE"). **Principiu:** reactivul DMAB formează cu triptofanul un produs de condensare colorat în violet palid; reacţia este apoi întărită prin cuplare secundară cu o sare diazo a acidului S (H) şi formarea unui colorant azoic. **Reactivi:** 1. HCl conc. 10 ml; ac. acetic cristalizabil 30 ml; p-dimetilaminobenzaldehidă 1 g; 2 apă dist. 6 ml; HCl sol. N 3 ml; acid S (8-amino-1-naftol-5-sulfonic) 240 mg; se răceşte la +4°C şi se adaugă 1 ml nitrit de sodiu; se lasă la rece 15 min.; pentru lucru se amestecă extemporan 1 ml din această sol. cu 40 ml acid acetic glacial. **Tehnica:** 1. fixare ca în tehnicile precedente şi includere în parafină; 2. secţiuni deparafinate cu xilol, apoi alcool absolut sau acetonă şi uscare la aer 30 sec.; 3. tratare 5 min. la 25°C cu sol. 1; 4. spălare 3×1 min. cu acid acetic glacial; 5. tratare 5 min. cu sol. 2 proaspăt preparată; 6. spălare 3×1 min. cu acid acetic glacial; 7. clarificare şi montare ca în tehnica precedentă. **Rezultat:** reacţia pozitivă pentru triptofan se manifestă printr-o coloraţie albastră intensă. **Observaţii:** în locul acidului S-diazotat se poate folosi şi o safranină diazotată (pag. 131).

c) METODA LILLIE-ADAMS CU XANTHIDROL. **Principiu:** xanthidrolul, în mediu acid, formează cu nucleul indol şi pirol un produs de condensaţie de culoare violetă-purpurie. **Reactivi:** 1. ac. acetic glacial 90 ml; ac. clorhidric conc. 10 ml; xanthidrol 2,5 g. **Tehnica:** 1. fixare ca în tehnicile precedente; 2. secţiuni deparafinate se trec în alcool absolut apoi se usucă timp de 30 sec.; 3. tratare cu sol. 1 timp de

Scanned with OKEN Scanner

5 min.; spălare de 3 ori cu ac. acetic glacial; 4. clarificare cu ac. acetic-xilol 1 : 1, apoi 1 : 5 și la urmă xilol pur; montare în mediu sintetic. **Rezultat:** triptofanul, prolina și hidroxiprolina din proteine sînt evidențiate de o coloraţie violetă-deschis.

4. REACȚII PENTRU EVIDENȚIEREA CISTEINEI ȘI CISTINEI (GRUPĂRILE -SH ȘI -S-S-)

Evidențierea aminoacizilor sulfuraţi prezintă o importanță deosebită, atît în histologia normală cît și în patologie, deoarece sînt constituenții a numeroase proteine sau produși de elaborare celulară, keratine, produși de neurosecreție hipofizară, anumite enzime (insulina, LSH), mioglobina, chimotripsinogenul etc. Există reacții deosebit de sensibile și suficient de specifice pentru gruparea sulfhidril. În schimb, grupările disulfurice nu sînt evidențiabile ca atare, ci doar după ce au fost convertite (reduse), printr-un pretratament adecvat, în grupe sulfhidril.

Pregătirea materialului pentru aceste reacții necesită precauții speciale. Pentru fixare se recomandă în primul rînd sol. apoasă 5% de acid tricloracetic sau sol. 1% din același acid în alcool 80°. Conservarea, sub aspectul păstrării raportului dintre grupele sulfhidril-disulfurice este excelentă, dar fixarea lasă de dorit sub aspect histologic. Fixarea cu formol neutralizat duce la o blocare a grupelor sulfhidril cu formare de acid tiazolidin-4-carboxilic dar reacția este reversibilă prin simplă spălare cu apă. Fixarea la rece cu lichidul Carnoy este foarte bună și permite efectuarea de reacții pentru diferențierea grupelor -SH și -S-S-. Fixatorii pe bază de sublimat duc la blocarea grupelor -SH, cu formarea de

Scanned with OKEN Scanner

mercaptide care ulterior, prin tratament cu agenţi reducători, sînt descompuse cu grupele -SH eliberate. Acest tratament duce însă la transformarea grupelor -S-S- în grupe -SH, deci aceşti fixatori se vor utiliza doar atunci cînd dorim să evidenţiem proteinele sulfhidrilate totale. Cu aceleaşi rezerve este utilizabil şi amestecul Bouin. Sînt contraindicate amestecurile pe bază de acid osmic sau bicromat de potasiu.

Reacţiile uzuale pentru evidenţierea proteinelor sulfhidrilate sînt diferite sub aspectul mecanismului (reacţii bazate pe puterea reducătoare a grupelor -SH, pe formarea de tioeteri, formarea de mercaptide, reacţii de oxidare etc.), dar în toate cazurile în care se tinde la o determinare mai exactă ele trebuie completate cu reacţii de control (reacţii de blocaj, reacţii pentru reducerea grupelor -S-S- în grupe -SH).

a) Metoda chèvremont-fréderic şi varianta lui Adams (au fost prezentate la pag. 103) se bazează pe puterea reducătoare foarte pronunţată a grupelor -SH şi -S-S-, dar acestea nu sînt singurele grupări cu această proprietate. În consecinţă, reacţia pozitivă este dată de numeroase alte substanţe: precursorii melaninei, granulele celulelor enterocromafine şi ale celulelor medulo-suprarenalei, ţesutul elastic, lipopigmenţii, unele lipide reducătoare etc. Sînt deci necesare diferite reacţii de blocaj pentru grupările reducătoare respective sau metode de extracţie a lipidelor.

b) Metoda deguchi. **Principiu:** grupele sulfhidril reduc sarea de tetrazolium cu formare de formazan de culoare albastră-neagră. Dacă se intervine cu agenţi reducători ca şi cianura de potasiu sau acidul tioglicolic se evidenţiază simultan grupele -SH şi

Scanned with OKEN Scanner

-S-S-; dacă se omite această reducere se evidenţiază doar grupele -SH. **Reactivi:** 1. sol. 0,5 M acid thioglicolic adusă la pH 8,0 chiar în momentul folosirii cu o sol. 1% NaOH; 2. sol. 1% acid acetic; 3. la 10 ml sol. apoasă 5% cianură de potasiu se adaugă sol. 0,2 M acid acetic pînă se realizează pH 8,4 apoi se adaugă 10 ml tampon borat 0,2 M cu pH 8,4 şi 15 mg Nitro-BT. Soluţia se poate păstra cîteva zile la —20°C. **Tehnica:** 1. probe proaspăt secţionate la 12—18 microni la criotom, uscate la aer apoi fixate în sol. 1% acid tricloracetic în alcool 80° şi colodinate; pe secţiuni din probe incluse în parafină reacţia este mai atenuată; 2. tratare cu sol. 1 timp de 2—3 ore la 50°; 3. spălare cu apă; 4. clătire rapidă cu sol. 2 apoi spălare cu apă curentă; 5. tratare timp de 30—60 min. în vas închis, la 37°C cu sol. 3; 6. spălare cu sol. 2 apoi cu apă curentă; 7. montare în glicerogel. **Rezultat:** prezenţa grupelor -SH şi -S-S- este indicată de o coloraţie albastră neagră, lipidele reducătoare dau o coloraţie roşie.

c) METODA BARRNETT-SELIGMAN („DDD") este considerată cea mai sensibilă şi specifică reacţie pentru grupele —SH şi —S—S—. **Principiu:** disulfura de 2,2′-dihidroxi-6,6′dinaftil (DDD) în mediu alcalin, formează cu grupările —SH tioeteri purtători de grupe naftol; acestea sînt vizualizate apoi prin cuplare cu o sare de diazonium şi formare de coloranţi azoici. Culoarea este în funcţie de sărurile de diazonium utilizate: roşie cu săruri monodiazoice ca Fast Red RC sau Fast Blue RR, albastră cu Fast Blue K; cu săruri avînd două grupe diazoice, ca Diazo-Fast Blue B se obţine culoare roşie dacă s-a făcut cuplajul cu o singură moleculă de tioeter sau albastră dacă cuplarea s-a făcut cu două molecule. **Reactivi:** 1. alcool absolut 15 ml; DDD 25 mg; 35 ml

Scanned with OKEN Scanner

tampon veronal-acetat 0,1 M cu pH 8,5; 2. sol. apoasă de ac. acetic cu pH 4—4,5 (aproximativ 0,01%); 3. Fast Red RC (Fast Blue B salt sau altă sare indicată mai sus) 50 mg; 50 ml tampon fosfat 0,1 M cu pH 7,4; se prepară extemporan; sol. 1 și 3 se pot utiliza o singură dată și sînt suficiente doar pentru 9 lame. **Tehnica:** 1. fixarea cu alcool-acid tricloracetic, formol, Bouin, Carnoy și includere în parafină, probe nefixate sau fixate în alcool-acid tricloracetic și secționate prin congelare; 2. secțiunile se etalează pe lame nealbuminizate, se colodinează. apoi se hidratează; 3. tratare timp de o oră la 50°C cu sol. 1; 4. se lasă în continuare în reactiv pînă acesta ajunge la temp. laboratorului; 5. clătire cu apă dist.; 6. spălare 2×5 min. cu sol. 2; 6. deshidratare gradată cu alcool 70°, 96° și absolut; 7. tratare cîte 5 min. cu alcool-absolut-eter în părți egale, apoi cu eter sulfuric pur (această spălare are rostul să elimine thionaftolii ce se formează concomitent cu tioeterii); 8. rehidratare treptată, trecînd prin alcool-eter, alcool absolut, alcool 96°, 70° (aprox. 5 min. în fiecare baie), apoi clătire cu apă dist.; 9. tratare 2 min. cu sol. 3; 10. spălare cu apă curentă, deshidratare cu alcool, clarificare cu xilol, montare în mediu sintetic. **Rezultat:** se evidențiază numai grupele —SH ale proteinelor; cu Fast Blue B se colorează în roșu dacă grupele sînt puțin abundente și în albastru dacă sînt abundente; cu Fast Red RC colorație în roșu; cu alte săruri vezi mai sus. **Observații:** pentru evidențierea concomitentă a grupelor —SH și —S—S— reacția se practică astfel: 1. secțiunile colodinate și hidratate se incubează 4 ore la 37°C într-o sol. 0,5 M acid tioglicolic proaspăt preparată și adusă la pH 8 cu o sol. 0,1 N de NaOH; 2. spălare

Scanned with OKEN Scanner

cu apă curentă; 3. spălare rapidă cu sol. 2 apoi cu apă curentă; 4. efectuarea reacției cu DDD ca mai sus.

G a b e recomandă montarea în medii anhidre doar în cazul utilizării de Fast Blue-B salt și atunci deshidratarea să se facă cu acetonă și nu cu alcool; în rest se recomandă montarea în medii apoase. Același autor afirmă că se poate reduce cantitatea de DDD din sol. 1 la 20 mg, fără inconveniente.

d) Reacții complementare pentru studiul grupărilor –SH și –S–S–. **Reacții pentru reducerea grupelor disulfurice.** Majoritatea tehnicilor prezentate mai sus evidențiază doar grupele sulfhidril. Pentru a evidenția și grupele disulfurice, acestea trebuie transformate, prin reducere, în grupe sulfhidril, după care se aplică una din tehnicile descrise și astfel se vor evidenția concomitent grupele sulfhidril preexistente, precum și cele disulfurice reduse. Ponderea grupelor disulfurice se va aprecia comparînd o secțiune pe care nu s-a practicat reducerea cu o secțiune învecinată pe care s-a aplicat reacția după o prealabilă reducere.

Reamintim că metodele de reducere eliberează grupele sulfhidril blocate în urma utilizării fixatorilor cu sublimat.

Există mulți agenți chimici reducători și eficacitatea lor este cu atît mai mare, cu cît durata lor de acțiune este mai lungă și pH-ul mai ridicat. Din această cauză se poate produce adesea dezlipirea secțiunilor, incident ce trebuie prevenit prin colodinare. Cei mai utilizați agenți reducători sînt:

— **Sulfura de amoniu** sau de sodiu, sol. apoasă 5% (pH 9,5) lăsată să acționeze timp de 2—3 ore la temp. laboratorului sau 1 oră la 37°C. La sfîrșit se va face o spălare foarte minuțioasă cu apă dist. de-

Scanned with OKEN Scanner

seori schimbată sau cu o sol. 1% acid acetic în apă distilată.

— **Acidul tioglicolic** în sol. apoasă 0,2—0,5 M cu pH 8,0 realizat prin adăugarea de sol. 0,1 M de NaOH; durata de acţiune este de 3—5 ore la 37°C. Urmează o spălare repetată cu apă acetifiată şi apoi cu apă dist. Se poate utiliza şi tioglicolatul de sodiu în sol. 10% adusă la pH 9,5 cu NaOH; durata de acţiune este de numai 10 min.

— **Tioglicerolul** (tiovanol) se prepară amestecînd 2 ml tioglicerol, 40 ml apă dist. şi 10 ml tampon borax-ac. boric pH 8,9—9,1; durata necesară reducerii este de 10 ore la 37°C; urmează spălare cu apă acetifiată, apoi cu apă distilată.

Observaţii: operaţia de reducere trebuie urmată imediat de aplicarea unei reacţii pentru grupe —SH, altfel există riscul ca o parte din grupele —SH să se oxideze şi să redevină grupe disulfurice. Lamele se pot lăsa în aşteptare doar în apă dist. cu 1% acid acetic.

Reacţii de blocaj pentru grupele sulfhidril. Cu excepţia metodei cu DDD, restul reacţiilor şi în special cele bazate pe evidenţierea funcţiei reducătoare (fericianura ferică şi tetrazolium alcalin) nu sînt strict specifice pentru grupările —SH şi —S—S— aşa încît pentru lucrările de precizie, se impune controlul prin blocaj. Se recomandă următoarele formule:

— **Iodul iodurat:** sol. apoasă 0,038% iod şi 0,03% iodură de potasiu cu pH 3,2 realizat cu o sol. 0,01 N de HCl; durata necesară blocajului este de aprox. 4 ore la temp. laboratorului.

— **Sublimatul** în sol. saturată (aprox. 7%) realizează blocajul lent, în aproximativ 72 ore.

Scanned with OKEN Scanner

— **N-etilmaleimida,** sol. 1,25% în tampon Sörensen cu fosfaţi, la pH 7,4 realizează blocajul în 4 ore la 37°C.

— **Iodoacetatul de sodiu** în sol. apoasă 2%, adusă la pH 8,0 cu sol. N/1 de NaOH; durata necesară blocajului este de 20 ore la 37°C.

— **Cloropicrina,** sol. 0,5% în alcool 30° realizează blocajul în aprox. 4 ore la temp. laboratorului.

Observaţii: reacţiile de blocaj prezentate se adresează în exclusivitate grupelor sulfhidril. Precizăm că primele două metode de blocaj, simple şi accesibile, au dezavantajul de a fi reversibile sub acţiunea unor agenţi reducători. Blocajul cu N-etilmaleimidă este considerat ca fiind cel mai specific şi sigur.

Interpretarea reacţiilor. Atunci cînd ne interesează numai evidenţierea grupărilor sulfhidril, vom supune o secţiune direct la reacţie, iar pe secţiunea vecină se va aplica reacţia după blocaj; prezenţa grupărilor sulfhidril este atestată de o reacţie directă pozitivă şi de reacţia negativă după blocaj.

Atunci cînd ne interesează evidenţierea concomitentă a grupelor sulfhidril şi disulfurice se practică pe o secţiune un procedeu de reducere şi apoi reacţia, iar pe alta se practică reducerea, apoi blocajul şi la urmă reacţia; prezenţa celor două feluri de grupări este atestată de reacţia pozitivă fără blocaj şi negativă după blocaj.

Distincţia între proteinele bogate în grupe sulfhidril şi cele cu grupe disulfurice se face efectuînd pe o secţiune o reacţie directă (controlată cu o lamă pe care s-a făcut în prealabil blocajul) iar pe altă secţiune o reducere urmată de reacţie (controlată şi aceasta printr-un blocaj intercalat între reducere şi reacţie). Grupările sulfhidril sînt atestate de reacţia

Scanned with OKEN Scanner

pozitivă ce apare pe lamele pe care nu s-a practicat reducerea prealabilă și pe cele pe care aceasta a precedat reacția. Grupele disulfurice sînt atestate de reacția pozitivă ce apare numai după practicarea reducerii.

D. ALTE METODE PENTRU STUDIUL HISTOCHIMIC AL PROTEINELOR

1. EVIDENȚIEREA CARACTERISTICILOR ELECTROPOLARE

Studiul general al acidofiliei și bazofiliei a fost prezentat la pag. 106, 107, metoda recomandată fiind cea a lui Deitch. Aplicată la studiul proteinelor, reacția evidențiază mai ales histonele și protaminele, datorită abundenței acestora în radicali electropozitivi sau bazici (grupări aminoprimare, imidazol și guanidil). O tehnică special adaptată pentru evidențierea histonelor este următoarea:

Metoda Alfert-Geschwind. **Principiu:** histonele prezintă în grupările lor laterale un număr mare de radicali bazici, din care cauză, punctul lor izoelectric este superior celui al altor proteine. Colorantul este Fast Green FCF, utilizat la un pH suficient de ridicat pentru ca acidofilia altor proteine să fie exclusă. Pentru a se evita interferența cu grupele bazice ale acizilor nucleici se practică și o prealabilă extracție cu acid tricloracetic. **Reactivi:** 1. sol. 5% ac. tricloracetic; 2. apă dist. 100 ml; Fast Green FCF 0,1 g; sol. 0,1 N de NaOH pentru a se realiza pH 8,1. **Tehnica:** 1. fixare cu formol, includere în parafină; 2. secțiuni deparafinate, colodinate și hidratate se mențin 15 min. în sol. 1 adusă, pe o baie marină, la temp. de fierbere; 3. spălare 3×10 min, cu alcool 70°, apoi

Scanned with OKEN Scanner

apă dist.; 4. colorare 30 min. cu sol. 2; 5. spălare 5 min. cu apă dist.; deshidratare, clarificare, montare în mediu sintetic. **Rezultat:** structurile ce conţin proteine bazice (mai ales histone şi protamine) se colorează în verde.

2. APRECIEREA ZONEI PUNCTULUI IZOELECTRIC

Această tehnică a fost expusă la pag. 108.

3. UTILIZAREA ENZIMELOR ÎN HISTOCHIMIA PROTEINELOR

Există în prezent un număr de enzime proteolitice suficient de bine purificate pentru a putea fi utilizate în histochimia proteinelor. Supunînd o secţiune acţiunii unei asemenea enzime, aceasta va cataliza în mod specific hidroliza unui anumit substrat care, astfel va fi înlăturat şi nu se va mai putea evidenţia printr-o reacţie histochimică adecvată.

Interpretarea rezultatelor unui asemenea studiu se face în general prin comparaţie, examinînd trei preparate, dintre care pe primul s-a aplicat digestia enzimatică, pe al doilea s-a aplicat doar solventul enzimei, iar al treilea este preparatul martor. Pe toate trei se aplică la urmă aceeaşi reacţie histochimică, pentru evidenţierea substanţei cercetate.

Fixarea de elecţie este în alcool, Carnoy sau alcool-formol, urmată de includere în parafină. Uneori, fixarea poate perturba reacţia enzimatică, aşa încît sînt de preferat secţiunile la criotom sau microtomul de congelare. Principalele proteaze utilizate în histochimie sînt:

a) Pepsina. Are pH-ul optim între 1,5—2. Ea acţionează asupra unui număr mare de proteine naturale: cazeină, globină, histone, ovalbumină, elasti-

Scanned with OKEN Scanner

na, colàgenul nativ; mai puţin asupra nucleoproteinelor şi keratinei şi deloc asupra colagenului, peptidelor cu greutate moleculară mare şi protaminelor. Pepsina acţionează în special asupra legăturilor peptidice ale unor aminoacizi aromatici (fenilalanina şi tirozina), precum şi asupra legăturilor făcute prin grupările carboxil ale acizilor dicarboxilici monoaminaţi (ac. aspartic şi glutamic). Se utilizează în soluţia: pepsină cristalizată 2 mg, sol. 0,02 N de HCl cu pH 1,6. Incubaţia se face timp de 2—3 ore la 37°C. Pe una din lame se pune sol. acidificată de pepsină, iar pe alta doar sol. de HCl. La sfîrşit se spală cu apă dist. şi se supun reacţiei histochimice dorite, împreună cu o a treia secţiune, care n-a fost supusă la nici un pretratament.

b) Tripsina. Are o activitate optimă la pH 7—9 şi acţionează în general asupra acelorași proteine ca şi pepsina, doar că această acţiune decurge mai bine dacă proteinele respective au fost în prealabil denaturate. Ca mecanism se admite că acţionează mai ales asupra legăturilor peptidice realizate prin grupările carboxil ale aminoacizilor bazici, în special lizina şi arginina. Se utilizează în sol.: tripsină cristalizată 0,1 mg şi 1 ml tampon fosfat 0,05 M cu pH 8,9. Se procedează ca în cazul pepsinei, durata de incubare fiind de 15 min. — 1 oră sau chiar mai mult.

c) Chimotripsina. Se utilizează mai ales Alfa-chimotripsina, care are o activitate optimă la pH 7—9. Spectrul ei de acţiune este mai larg ca la precedentele, căci hidrolizează atît legăturile realizate prin grupările carboxil ale aminoacizilor aromatici (tirozină, fenilalanină, triptofan), cît şi legăturile peptidice la care sînt implicaţi aminoacizi ca leucina, metionina, asparagina şi glutamina. Se utilizează la fel ca tripsina, dar în tampon fosfat 0,01 M cu pH 7,6.

Scanned with OKEN Scanner

d) Colagenaza și elastaza prezintă interes în studiul scleroproteinelor din țesutul conjunctiv normal sau patologic.

Colagenaza digeră în mod electiv colagenul, reticulina și gelatina. Activitatea optimă se situează în general la pH 7,4. Se utilizează în sol: 1 mg colagenază din clostridium histoliticum, sol. 0,9% ClNa 1 ml. Incubarea se face la 50°C timp de 45—60 min. După spălare cu apă dist., lamele se trec la impregnare pentru reticulină și colorație tricromică (Van Gieson, Masson etc.) pentru colagen. Utilizarea colagenazei nu este posibilă la probe fixate în formol, ci numai după fixări cu alcool sau Carnoy.

Elastaza digeră în mod specific elastina și keratohialinul din epiderm. Activitatea optimă se află la pH 8,4—9,8. Se pare că în preparatele comerciale se află în complex de enzime, dintre care o parte acționează doar asupra cimentului mucopolizaharidic al fibrelor elastice. Se utilizează sol.: 1 ml tampon Veronal-acetat cu pH 8,4—9,8, elastază cristalizată de origine pancreatică 1 mg. Durata de incubare este de 30—60 min. la 37°C. Utilizarea proteazelor în studiul histochimic al proteinelor prezintă încă numeroase neajunsuri. În primul rînd există posibilitatea ca preparatele enzimatice comerciale să fie totuși contaminate cu alte emzime, chiar și în cazul preparatelor cristalizate. În acest caz digestia unei anumite structuri din secțiune nu atestă cu siguranță că structura respectivă este constituită exclusiv din substratul enzimei. Excluderea acestei incertitudini este posibilă în unele cazuri prin utilizarea unor inhibitori enzimatici specifici. În schimb, absența aspectului de digestie asupra unei anumite structuri în cazul în care folosim un preparat enzimatic verificat, ne indică destul de sigur faptul că structura respectivă

Scanned with OKEN Scanner

nu conţine substratul specific. Trebuie avut apoi în vedere faptul că o serie de factori ce intervin în cursul pregătirii probelor (fixare, includere etc.) pot modifica în mare măsură proprietăţile reactive ale proteinelor, digestia enzimatică fiind astfel favorizată sau alteori împiedicată.

Pentru toate aceste considerente în acest gen de cercetare trebuie făcute toate probele de control posibile, iar interpretarea rezultatelor să fie făcută cu mult discernămînt.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL VI

ACIZII NUCLEICI ȘI NUCLEOPROTEINELE

Metodele de evidențiere pe secțiuni histologice a acizilor nucleici sau a nucleoproteinelor vizează demonstrarea distinctă a diferiților componenți: bazele purinice, pirimidice, riboza și dezoxiriboza, acidul fosforic și fracțiunea proteică (protamine și histone).

Identificarea calitativă și cantitativă a acizilor nucleici pe baza prezenței bazelor purinice și pirimidice se face mai ales printr-o metodă histofizică și anume, microspectrografia de absorbție în ultraviolet. Metodele histofizice cu aplicare în studiul constituției chimice a țesuturilor nu au fost incluse în acest volum.

Metodele de detectare a acizilor nucleici, bazate pe prezența ribozei și dezoxiribozei, pun în joc fie reacții de culoare ce permit distincția simultană a celor două oze, fie în cazul dezoxiribozei, se eliberează prin hidroliză radicalul carbonil, fapt ce permite apoi aplicarea unor reacții pentru aldehide.

Metodele pentru studiul acizilor nucleici, bazate pe prezența radicalului acid fosforic recurg la evidențierea bazofiliei cu ajutorul unor coloranți adecvați.

În sfîrșit, metodele bazate pe prezența componentei proteice a acizilor nucleici recurg, fie la unele

Scanned with OKEN Scanner

reacţii pentru aminoacizi (tirozină, arginină, vezi pag. 143), fie la evidenţierea caracteristicilor electropolare.

Specificitatea acestor categorii de metode nu este echivalentă, aşa că în numeroase cazuri se impune controlul reacţiilor, mai ales prin procedee de extracţie selectivă, chimică sau enzimatică, a acizilor nucleici.

Rezultatul reacţiilor este în foarte mare măsură determinat de pretratamentul probelor şi în special de fixare. Proprietăţile fizice ale acizilor nucleici sînt determinate mai ales de faptul că aceştia se află în celulă în diferite grade de polimerizare. Într-o măsură mai mare sau mai mică, toţi fixatorii chimici modifică proprietăţile fizice ale acizilor nucleici şi majoritatea le modifică şi proprietăţile chimice. Fixatorii de elecţie sînt cei precipitanţi şi mai ales alcoolul, amestecurile pe bază de alcool şi acid acetic. Amestecul Carnoy se bucură de o aprobare unanimă. Fiind un amestec acid realizează prin precipitarea nucleoproteinelor o bună fixare morfologică, iar prin ruperea progresivă a legăturilor dintre acizii nucleici şi proteine eliberează un număr mare de grupări reactive acide, fapt ce favorizează mult reacţiile bazate pe evidenţierea bazofiliei. Durata fixării cu amestecul Carnoy şi în general cu fixatorii acizi trebuie limitată la strictul necesar, căci modificînd proprietăţile fizice ale acizilor nucleici, se facilitează în primul rînd extracţia ARN, iar la fixări de lungă durată, chiar şi ADN.

Formolul, atît de util în studiul protidelor, nu este recomandat pentru nucleoproteine şi acizi nucleici, deoarece blochează numeroase grupări reactive şi prin aceasta, reduce mult afinitatea faţă de coloranţii acizi sau bazici. Adaosul de sublimat sau

Scanned with OKEN Scanner

bicromat de potasiu ameliorează substanţial fixarea cu formol, dar prezenţa acestor metale nu este compatibilă cu controlul prin extracţie enzimatică a ADN şi ARN. Cînd se efectuează aceste teste se va avea în vedere că alcoolul şi amestecul Carnoy lasă ARN în stare solubilă, aşa încît este greu de precizat gradul extracţiei specifice, datorate ARN-azei şi al celei nespecifice, datorată sol. tampon ce conţine enzima. Este deci de preferat în aceste cazuri formolul, chiar dacă acesta va impune o prelungire a duratei acţiunii enzimatice.

Probele prelucrate prin congelare-deshidratare se recomandă să fie fixate cu vapori de formaldehidă timp de 3 ore la 50°C (vezi şi pag. 31).

Prezentăm în continuare principalele metode histochimice pentru acizii nucleici şi nucleoproteine bazate pe principiile enunţate mai înainte.

A. METODE PENTRU HISTONE ŞI BAZE PIRIMIDINICE

1. METODELE DEITCH CU GALBEN NAFTOL-S ŞI ALBERT-GESCHWINND CU FAST GREEN FCF pentru proteinele bazice au fost prezentate la pag. 106, respectiv la pag. 157.

2. METODA JOBST-SANDRITER. **Principiu:** acidul metafosforic reacţionează cu grupele amino şi guanidino, vizualizarea făcîndu-se cu ajutorul unui lac de gallocianină. **Reactivi:** 1. sol. apoasă 5% ac. tricloracetic; 2. se dizolvă prin agitare, la 20°C, 0,8 g acid metafosforic cristalizat în 100 ml apă dist.; 3. se fierb timp de 10 min. 150 mg gallocianină într-o sol. apoasă 5% alaun de crom; la sfîrşit se aduce volumul ad 100 ml cu apă dist. **Tehnica:** 1. metoda se

Scanned with OKEN Scanner

aplică pe preparate obținute prin strivire, amprente sau frotiuri, uscate la aer, apoi fixate cu alcool sau formol; 2. extracția ADN prin tratare timp de 15 min. cu sol. 1 încălzită la 95°C; 3. clătire de 3 ori cu alcool 70°, apoi cu apă dist.; 4. tratare o oră la 20°C cu sol. 2; 5. spălare 3×1 min. cu apă dist.; 6. colorare 48 ore la 20°C cu sol. 3; 7. spălare 5 min. cu apă curgătoare, deshidratare cu alcool, clarificare cu xilol, montare în mediu sintetic. **Rezultat:** proteinele bazice se colorează în albastru închis.

3. Metoda Spicer pentru histone și proteine bogate în arginină. **Principiu:** sol. de Biebrich scarlet, colorant diazoic sulfonat evidențiază la pH 9,5 histonele iar la pH 10,5—11 proteinele nucleare bogate în arginină. **Reactivi:** 1. sol. colorantă cu pH 9,5: 7 ml sol. 1 N de NaOH, 20 ml sol. 1 N de glicocol, 13 ml apă dist. și 16 mg Biebrich scarlet; 2. sol. colorantă cu pH 10,5—11: 17 ml sol. 1 N de NaOH, 20 ml sol. 1 N glicocol, 3 ml apă dist, și 16 mg Biebrich scarlet. Dacă la determinare pH-ul nu corespunde se va corecta cu sol. 1 N de NaOH. **Tehnica:** 1. fixare cu alcool sau 24 ore cu amestecul: sol. apoasă saturată, sublimat avînd pH-ul 5,6 prin adăugare de sol. 1,3% acetat de sodiu; 2. includere în parafină, deparafinare, hidratare, eliminarea precipitatului mercuric, spălare cu apă; 3. colorare 30—60 min. cu sol. 1 sau 2; 4. trecere directă în alcool 96° și absolut, apoi în amestec 1 : 1 de alcool — xilol, xilol pur, montare. **Rezultat:** cu sol. 1 histonele nucleare se colorează în roșu-oranj, iar cu sol. 2 proteinele bogate în arginină se colorează în roșu. **Observații:** metoda poate fi precedată de reacția Feulgen (pag. 174) în cazul în care se folosește sol. 1 cu pH 9,5.

Scanned with OKEN Scanner

4. Metoda Black-Ansley pentru nucleohistone. **Principiu:** o sol. amoniacală de azotat de argint colorează diferențiat nucleohistonele bogate în lizină și cele bogate în arginină. **Reactivi:** 1. se picură într-o sol. apoasă 10% azotat de argint atît amoniac conc. pînă cînd sol. prezintă o tulburare persistentă (aprox. 10 : 1); 2. sol. apoasă 3% de formol. **Tehnica:** 1. metoda se aplică pe frotiuri, amprente și preparate cromozomiale, fixate cel puțin 15 min. cu formol sau pe secțiuni la criotom, fixate ulterior tot cu formol; 2. clătire în 5 băi de apă dist.; 3. tratare cu sol. 1 timp de 5—10 sec., agitînd lamele mereu; 4. spălare ca mai sus; 5. reducere timp de 2 min. cu sol. 2; 6. spălare ca mai sus; 7. deshidratare, clarificare, montare. **Rezultat:** nucleohistonele bogate în lizină se colorează în galben, iar cele bogate în arginină se colorează în negru.

5. Metoda Smith-Anderson pentru evidențierea bazelor pirimidinice din ADN cu ajutorul hidrazinei. **Reactivi:** 1. alcool izopropilic 37,5 ml; apă dist. 4,5 ml; hidrazină anhidră 8 g (deshidratare prin tratare cu NaOH granule, dizolvare în eter de petrol și distilare la 113—114°C). **Tehnica:** 1. fixare cu formol, alcool, alcool-ac. acetic, Carnoy și includere în parafină; 2. deparafinare cu xilol, apoi alcool 80°; 3. clătire în 3 băi cu alcool izopropilic absolut; 4. tratare 4 ore cu sol. 1 preîncălzită la 50°C; 5. spălare în 3 băi de alcool izopropilic, 5 min. în fiecare; 6. tratare timp de 1 oră în amestec 1 : 1 de benzaldehidă-alcool izopropilic; 7. spălare 3×20 min. cu alcool izopropilic, apoi clătire cu apă dist.; 8. tratare cu reactiv Schiff (pag. 119) timp de 1 oră; 9. spălare 3×2 min. cu apă sulfuroasă (pag. 121); 10 spălare

Scanned with OKEN Scanner

10 min. cu apă curgătoare, deshidratare, clarificare, montare în mediu sintetic. **Rezultat:** pirimidinele din ADN se colorează în albastru purpuriu.

B. METODELE BAZATE PE EVIDENȚIEREA BAZOFILIEI ACIZILOR NUCLEICI

Acestea pot fi considerate specifice doar dacă bazofilia dispare după efectuarea digestiei enzimatice. Se utilizează în acest scop numeroși coloranți: gallocianina, verdele de metil (singur sau în asociație cu pironina), precum și tiazine ca: tionina, toluidina, azur A. Acestea din urmă sînt de obicei stabilizate cu molibdat de amoniu. În toate cazurile, sol. colorante se aduc, prin tamponare, la un pH 3,7—4,2, deci inferior punctului izoelectric al majorității proteinelor tisulare.

1. Metoda Einarson cu gallocianină. **Principiu:** la pH 1,5—1,75 lacul cromic de gallocianină fixîndu-se de grupele fosforice, evidențiază electiv acizii nucleici. **Reactivi:** 1. se dizolvă 0,15 g gallocianină în 100 ml sol. apoasă 5% alaun de crom; se aduce la temp. de fierbere și se menține astfel 3—5 min.; se lasă timp de 24 ore, apoi se filtrează; se completează volumul la 100 ml cu apă dist.; pH-ul soluției, este de aprox. 1,64; soluția se conservă bine cîteva luni. **Tehnica:** 1. fixare în fixatori histologici uzuali, exceptînd ac. osmic sau probele postcromizate, includere în parafină; 2. deparafinare, colodinare, hidratare; 3. colorare 24—48 ore cu sol. 1; 4. spălare 5 min. cu apă curentă, deshidratare, clarificare, montare. **Rezultat:** ADN și ARN se colorează în albastru închis.

Scanned with OKEN Scanner

2. Metoda Pollister-Leuchtenberger cu verde de metil. **Principiu:** verdele de metil este un colorant bazic cu mare afinitate față de ADN, dar și față de alte structuri ca: granulațiile mastocitelor, unele mucine, condrina etc. **Reactivi:** 1. verdele de metil este întotdeauna impurificat cu violet de metil, din care cauză va fi purificat prin extracția acestuia din urmă cu cloroform. Acest lucru se poate face în două moduri: a). se dizolvă cantitatea necesară de verde de metil în 200 ml apă dist. într-un balon de decantare, apoi se adaugă 20 ml cloroform și se agită cîteva minute; se decantează cloroformul și operația se repetă de 4—6 ori, cu aceeași cantitate de cloroform, pînă cînd acesta nu se mai colorează în violet; b) se pune colorantul direct în cloroform, tot într-un balon de decantare și se spală ca mai sus, pînă cînd cloroformul este incolor sau slab violet. Se decantează cea mai mare parte a cloroformului, iar ceea ce rămîne se usucă în etuvă; pulberea obținută se cîntărește și apoi se face o sol. apoasă 1%. Astfel păstrat, verdele de metil nu se mai transformă în violet de metil. Colorantul este foarte sensibil la alcaline, din care cauză se păstrează în sticlă neutră, iar montarea se va face numai în medii sintetice neutralizate.

Sol. de lucru se prepară astfel: sol. apoasă 1% verde de metil 25 ml, fenol 0,5 g, glicerină 20 ml, alcool 96° 25 ml, apă dist. 100 ml; se conservă la întuneric. **Tehnica:** 1. fixare în Carnoy, Clarke (3 p. alcool absolut, 1 p ac. acetic glacial) sau sublimat — ac. acetic; sînt contraindicate amestecurile pe bază de acid osmic, crom, ac. picric și formol; 2. deparafinare, colodinare, hidratare; 3. colorare 15 min. cu sol. de verde de metil; 4. clătire cu apă dist. răcită la 3°C; 5. sugativare cu hîrtie de filtru; 6. deshidra-

Scanned with OKEN Scanner

tare timp de 12 ore în 2 băi de alcool, alcool butilic terţiar, clarificare cu xilol, montare în mediu sintetic. **Rezultat:** ADN se colorează în verde. **Observaţii:** atunci cînd nu se urmăresc determinări cantitative, deshidratarea se poate face în mod obişnuit cu alcool.

3. Metoda unna-pappenheim. **Principiu:** se utilizează doi coloranţi bazici, verdele de metil şi pyronina, care în soluţii cu pH 4—5 evidenţiază ADN şi ARN printr-o bazofilie diferenţială, electivitatea verdelui de metil pentru ADN şi a pyroninei pentru ARN datorîndu-se probabil unui mecanism electrostatic. **Reactivi:** 1. apă dist. 100 ml; alcool 96° 2,5 ml; glicerină 20 ml; verde de metil (purificat ca mai sus) 0,15 g; pyronină G (Y) sau B, 0,25 g; fenol 0,5 g; sol. se păstrează la întuneric cîteva luni. **Tehnica:** 1. fixare în Carnoy, Clarke (pag. 27) cel mult 24 ore, eventual fixare scurtă în Zenker, Helly, Maximov sau Regaud; includere în parafină; 2. deparafinare, colodinare, hidratare; 3. colorare 5—6 min. cu sol. 1; 4. clătire rapidă cu apă dist. (facultativ); 5. sugativare cu hîrtie de filtru; 6. deshidratare rapidă cu alcool absolut, clarificare cu xilol, montare în mediu sintetic. **Rezultat:** structurile nucleare ce conţin ADN se colorează în verde, iar nucleolii şi structurile citoplasmatice care conţin ARN se colorează în roşu. **Observaţii:** Lison recomandă să se dizolve cantităţile prescrise de verde de metil şi pyronină în 200 ml apă şi să se purifice împreună cu cloroform, cum s-a descris la pag. 168.

Varianta Lison: se purifică împreună cu cloroform, 1,5 g verde de metil şi 2,5 g pyronină Y dizolvate în 200 ml apă dist.; pentru lucru se amestecă 20 ml din această sol. cu 20 ml tampon fosfat

Scanned with OKEN Scanner

M/10, pH 4—5,5 și 60 ml apă dist.; sol. se răcește la +3°C. **Tehnica:** punctele 1—3 ca mai sus; 4. colorare la rece 30—60 min.; 5. clătire foarte rapidă cu apă dist. (2—3 sec.); 6. sugativare cu hîrtie de filtru; 7. deshidratare 5 sec. cu alcool butilic terțiar, clarificare cu xilol, montare în mediu sintetic.

Varianta Brachet asociază colorației cu verde de metil și pironină **controlul cu ribonuclează. Reactivi:** 1. sol. tampon pH 4,16: 75 ml ac. acetic glacial sol. 0,2 M: 25 ml sol. 0,2 M acetat de sodiu; dacă pH-ul nu corespunde se corectează cu una din cele două soluții; 2. se dizolvă 0,5 g verde de metil în 100 ml sol. tampon, apoi se purifică cu cloroform (pag. 169); 3. sol. de lucru se prepară din: 100 ml sol. 2 și pyronină 0,1 g; se conservă la rece și întuneric cîteva luni; 4. sol. 0,1% ribonuclează în apă dist. **Tehnica:** 1. fixare în Carnoy, formol Baker sau Lillie (pag. 23, 27), deshidratare 2×30 min. cu alcool butilic normal, impregnare la 56°C cu amestec 1 : 1 alcool butilic-parafină topită, timp de 1 oră, apoi 4×30 min. parafină pură; 2. **testul A:** secțiuni deparafinate, hidratate se colorează cu sol. 3 timp de 5 min. la temp. laboratorului; clătire rapidă cu apă dist., sugativare, deshidratare 30 sec. cu amestecul 3 : 1 alcool butilic terțiar-alcool etilic absolut 2×5 min. xilol, montare; 3. **testul B:** pe o secțiune vecină se face digestia enzimatică timp de 1 oră la temp. laboratorului cu sol. 4, după care se efectuează testul A: pe o a treia lamă se face testul B numai cu solventul enzimei, adică apă dist., după care se practică testul A. **Rezultat:** ADN se colorează în verde (dar și alte structuri bazofile); ARN se colorează în roșu, colorația fiind specifică dacă nu se produce pe lamele supuse testului B.

Scanned with OKEN Scanner

4. Metoda Love-Walsh cu toluidină-molibdat. **Principiu:** fixarea cu formol inactivează grupările amino și eliberează pe cele fosforice care vor fixa colorantul bazic, albastrul de toluidină. Intervenția polimolibdaților constă în aceea că vor conferi complexelor colorate diferite grade de metacromazie. Valoarea metodei este dată de faptul că diferite ribonucleoproteine din nucleu și citoplasmă se inactivează în mod diferențiat și că datorită unor deosebiri sterice moleculare se colorează diferit. **Reactivi:** 1. soluție de albastru de toluidină (vezi concentrațiile de mai jos) în tampon Mc Ilvaine pH 3,0; 2. sol. apoasă 0,85% clorură de sodiu; 3. sol. apoasă 5% ac. tricloracetic; 4. fixator cu formol-sublimat (1 p. formol conc. și 9 p. sol. 6% sublimat); 5. sol. Lugol; 6. sol. 5% tiosulfat de sodiu; 7. sol. apoasă 4% molibdat de amoniu. **Tehnica pentru varianta A** (vezi tabelul 5); 1. metoda se aplică pe culturi celulare sau amprente umede, clătite imediat timp de 10 sec. cu sol. 2; 2. se trec apoi imediat în sol. 3 pentru 10 min.; 3. clătire rapidă cu apă dist.; 4. fixare 5 min. cu sol. 4; 5. spălare cu apă curentă, apoi tratare 5 min. cu sol. 5; 6. tratare 5 min. cu sol. 6; 7. colorare 30 min. cu sol. 1; 8. tratare 15 min. cu sol. 7; 9. clătire rapidă cu apă curentă, deshidratare cu alcool butilic terțiar, clarificare cu xilol, montare în mediu sintetic. **Rezultat:** în funcție de varianta adoptată (A—E) se evidențiază următoarele nouă aspecte ale nucleoproteinelor (RNP și DNP): I: RNP nucleolare (din pars amorfa) și paracromatina granulară din nucleoplasmă; II: RNP de tip A din cromozomi în cursul pro, meta, ana și telofazei; III: RNP de tip B din cromatina interfazică; IV: RNP citoplasmatice de tip A din citoplasmă în interfază; V: RNP citoplasmatice difuze, de tip B; VI: RNP

Scanned with OKEN Scanner

pericromozomiale; VII: RNP granulare citoplasmatice; VIII: pars amorfa nucleolară; IX: paracromatina amorfă în relaţie cu aparatul fusorial.

Tabelul 5

Varianta tehnică	Tipuri de RNP evidenţiate	Fixarea		Albastru de toluidină		Molibdatul de amoniu	
		ATCA*	$HgCl_2$	Conc. (%)	Timp (min.)	Conc. (%)	Timp (min.)
A	I,II	10 min.	5 min.	S	30	4	15
B	I,II,IV	10 min.	5 min.	S	120	15	7
C	II,V,VII şi DNP	10 min.	5 min.	0,5S	120	15	15
D	VI, VII	10 min.	45 min.	S	60	4	40
E	IX	Se omite	3—5min. la 37°C	0,8S	120	4	30

* ATCA = acid tricloracetic.
S = conc. standard egală cu 4—9 mg la 100 ml tampon.

Varianta Love-Liles se poate aplica pe frotiuri şi secţiuni şi evidenţiază diferite aspecte de ARN. Distincţia faţă de ADN se face prin test de extracţie sau prin efectuarea reacţiei Feulgen. **Reactivi:** 1. fixator cu formol-sublimat, ca mai sus; 2. sol. Lugol şi sol. 5% tiosulfat de sodiu; 3. sol. 0,01% albastru de toluidină în tampon McIlvaine pH 3; 4. aceeaşi sol. dar cu concentraţie 0,004%; 5. sol. 5% molibdat de amoniu; 6. aceeaşi sol. dar cu concentraţie 15%; 7. reactiv Van Slyke: sol. apoasă 60% nitrit de sodiu 10 ml; ac. acetic glacial 5 ml; apă dist. 25 ml. **Tehnica:** 1. probe mici de ţesuturi se fi-

Scanned with OKEN Scanner

xează timp de 1 oră în sol. 1; includere în parafină, iar după deparafinare se practică o postfixare (vezi tabelul 6), la fel și pentru frotiuri. Se prelucrează în mod diferențiat 5 lame.

Tabelul 6

Preparatul	Lama nr.	Formol sublimat la 25°C (min.)	Formol sublimat la 37°C (min.)	Lugol, tiosulfat, spălare cu apă	Reactiv Van Slyke (ore)	30 min. în albastru de toluidină sol. (%)	30 min. în molibdat de amoniu sol. (%)
Frotiuri	1 și 2	Nu	5 resp. 10	In ordine: —apă curentă; — Lugol —Tiosulfat —apă curentă (cîte 5 minute în fiecare)	Nu	0,01	5,0
	2						
	3 și 4	Nu	60 respectiv 120		Nu	0,01	5,0
Secțiuni	5	Nu	60		18	0,004	15,0
	1	60 agitînd repetat	Nu		Nu	0,01	5,0
	2,3 și 4		120; 180 și respectiv 240		Nu	0,01	5,0
	5		Nu		18	0,01	15,0

În încheiere, la acest grup de reacții bazate pe evidențierea bazofiliei acizilor nucleici, precizăm că, deși valoroase și expeditive pentru lucrările curente, ele nu devin reacții într-adevăr specifice decît dacă, prin procedee de control, stabilim că bazofilia este datorată acizilor nucleici și nu unor grupări anionice din substanțe de altă natură.

Scanned with OKEN Scanner

C. REACȚII NUCLEALE

Sînt cuprinse sub această denumire, reacțiile de identificare ale ADN bazate pe prezența dezoxiribozei în molecula acestuia. Dintre toate aceste reacții, cea introdusă în histologie de către Feulgen și Rossenbeck (1924) este considerată și în prezent nu numai cea mai specifică și mai precis localizatoare reacție pentru ADN, dar și una dintre cele mai valoroase metode din întreaga tehnică histochimică. Vom prezenta în detaliu modalitățile de realizare și interpretare ale acestei tehnici, iar în continuare o serie de tehnici mai recente, bazate însă pe aceleași principii.

1. Reacția Feulgen-Rossenbeck. Mecanismul chimic nu este nici în prezent cunoscut în toate amănuntele. Reacția constă din două momente esențiale: hidroliza acidă și reacția de vizualizare cu ajutorul reactivului Schiff.

a) **Hidroliza** acidă dirijată duce la separarea selectivă din moleculele de ADN a bazelor purinice și apoi ale celor pirimidice, ajungîndu-se la formarea unor produși de degradare, lipsiți de aceste baze, numiți acizi apurinici. Desfacerea legăturii glucozidice a bazelor cu moleculele de dezoxiriboză, aflate în molecula de ADN sub forma furanozică, determină apariția de grupări pseudo-aldehidice la carbonul 1 al dezoxiribozei. În al doilea moment al reacției, aceste grupări sînt responsabile de recolorarea reactivului Schiff, prin formarea unor produși de condensare colorați. Reacția este unanim considerată ca fiind foarte specifică: o reacție pozitivă indică prezența ADN, iar una negativă absența acestuia. ARN nu este evidențiat prin reacție deoarece prezența radicalului —OH pe carbonul 2 al ribozei

Scanned with OKEN Scanner

împiedică hidroliza cu ClH. Şi valoarea topochimică a reacţiei este considerată ca fiind foarte bună deoarece, chiar dacă are loc o depolimerizare oarecare a moleculelor de ADN, produşii rezultaţi nu trec în soluţie decît în măsură extrem de redusă. Ca sursă de eroare sînt totuşi acetalfosfatidele sau plasmalogenii prin hidroliza cărora se pot elibera grupe aldehidice care să reacţioneze cu reactivul Schiff. Acest risc nu există în cazul secţiunilor la parafină ci doar în acel al secţiunilor prin congelare. Şi în acest caz, prin extracţia plasmalogenilor prin tratament cu alcool de 90° sau inactivarea lor cu o sol. de clorură de hidroxilamină în acetat de sodiu, sursa de eroare poate fi eliminată.

Fixarea este strîns corelată cu hidroliza. De preferat sînt fixatorii care pe de o parte realizează o bună conservare a detaliilor citologice, iar pe de altă parte favorizează reacţia. Amestecul Bouin este contraindicat deoarece produce chiar el hidroliza, care continuată cu HCl devine excesivă. Formolul şi amestecul Carnoy sînt de asemenea fixatori mediocri. Sînt indicaţi mai ales fixatorii cuprinşi în tabelul 7 care sînt şi excelenţi fixatori citologici. În general vom prelucra probe de dimensiuni mici, căci are influenţă şi viteza de penetrare a fixatorului. Pe probele mari se observă o reacţie mai intensă în zonele periferice decît în centru. Acest lucru nu se observă la probele tratate prin congelare-inhidratare şi fixate apoi prin vapori de formaldehidă timp de 30—60 min. sau la secţiunile la criotom cu fixare pe lamă.

Hidroliza se practică în general cu o sol. N. de HCl preîncălzită la 60°C. Durata hidrolizei este determinată de fixatorul utilizat. O durată prea scurtă nu va elibera suficiente grupări aldehidice şi reacţia

Scanned with OKEN Scanner

va fi slabă. O durată prea lungă va duce la depolimerizarea şi extracţia acizilor nucleici şi a histonelor, cu timpul ajungîndu-se pînă la anularea reacţiei. În tabelul prezentat (7), durata minimă marchează momentul în care reacţia începe să se producă, durata optimă indică momentul în care se obţine maximum de intensitate, iar durata maximă ne semnalează momentul în care reacţia începe să slăbească prin mecanismul amintit mai sus.

M. G a b e recomandă să se lucreze cu fixatori la care intervalul dintre durata optimă şi cea maximă este mai mare, asigurîndu-ne astfel un interval de „toleranţă“ necesar atunci cînd se prelucrează un număr mare de preparate. Cînd totuşi sîntem nevoiţi să facem reacţia pe probe fixate în Bouin, hidroliza nu va depăşi durata de 2 min.

Unii autori practică hidroliza la temp. laboratorului şi s-a constatat că pierderile prin extracţie sînt mai reduse, iar rezultatul topochimic şi optic mai bun. D e c o s s e şi A i e l l e au efectuat o hidroliză la 26°C cu sol. 5 N de HCl cu o durată de 40 min. pentru frotiuri de sînge fixate în metanol-formol-ac. acetic. Pentru alte preparate şi alţi fixatori, durata de hidroliză ar putea fi stabilită prin tatonare.

S-a preconizat hidroliza şi cu alţi acizi; percloric, citric, cromic, azotic, sulfuric etc. dar fără avantaje evidente. Hidroliza la 60°C cu HCl-n preparat cu etanol absolut conservă bine ADN cu greutate moleculară mai mică. Hidroliza cu ac. tricloracetic ar păstra mai bine histonele, iar cea cu ac. citric ar împiedica difuzarea dezoxiribozelor.

În toate cazurile, hidroliza se întrerupe prin spălare cu apă dist. rece.

b) **R e a c ţ i a d e v i z u a l i z a r e** cu reactivul Schiff, precum şi modul lui de preparare şi al echi-

Scanned with OKEN Scanner

valenţilor săi s-a descris la pag. 119—122. Durata de acţiune necesară este în general de cel mult o oră. Este bine să se practice un control supunînd secţiuni doar la tratamentul cu reactiv Schiff, fără hidroliză prealabilă, dar vom avea în vedere faptul că reactivul, datorită acidităţii lui poate provoca şi el hidroliza, atunci cînd durata lui de acţiune este prea lungă.

Tehnica reacţiei Feulgen-Rossenbeck pe secţiuni la parafină: 1. fixare cu amestecurile recomandate în tabelul 7 şi includere obişnuită în parafină; 2. deparafinare, colodinare, hidratare, eliminarea precipitatului mercuric dacă este cazul; 3. clătire cu HCl-n rece (facultativ); 4. hidroliză în HCl-n preîncălzit la 60°C; durata este în funcţie de fixatorul utilizat (tabelul 7); menţinerea constantă a temperaturii este foarte importantă, variaţii de 2°C; pot influenţa substanţial rezultatul; 5. clătire rapidă cu HCl-n rece apoi cu apă dist.; 6. tratare cu reactivul Schiff timp de 30—60 min. la temp. laboratorului; 7. spălare cu apă sulfuroasă 3×2 min. (pag. 121), apoi 5 min. cu apă curentă; 8. deshidratare cu alcool, clarificare cu xilol, montare în mediu sintetic sau balsam. **Rezultat.** ADN se colorează în roşu-violet. Pe secţiunile supuse la digestie cu ADN-ază (pag. 183), extracţie chimică (pag. 184) sau acelea la care hidroliza s-a exclus, reacţia trebuie să fie negativă.

Observaţii: atunci cînd utilizarea reacţiei se face în scopul unui studiu morfologic este posibilă, după punctul 7, intercalarea unei colorații de fond: colorare 1 min. cu sol. apoasă 0,5% verde lumină; colorare 10—15 sec. cu picroindigocarmin sau tratare 10 min. cu ac. fosfotungstic sol. 5%, apoi 5 min. cu albastru de anilină-orange G din azanul lui Heidenhain (Feulgen-azan).

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 7

Durata hidrolizei cu ClH-normal, la 60° C în funcție de lichidul fixator (adus în prealabil la această temperatură)
(după M. Gabe și E. Pearse)

Lichidul fixator	Timpul de hidroliză		
	Minim	Optim	Maxim
Apathy	4	5	8
Bouin-Alen (B 15)	19	22	40
Bouin-Alen-sublimat	10	14	25
Carnoy	4	6	8
Champy	16	25	40
Clarke	4	6	8
Flemming	16	36	60
Formol	5	8	12
Heitz	16	25	40
Helly	4	8	16
Maximov	4	8	16
Petrunkevitch	2	3	6
Regaud	6	14	60
Sanfelice	3	6	60
Susa-Heidenhain	12	18	25
Telliesniitzky	8	12	20
Zenker	4	5	12
Vapori de formaldehidă (congelare-deshidratare)	—	30—60	—
Formol-sublimat	—	8	—
Zenker-formol	—	5	—
Newcomer	—	20	—

Varianta Voss pentru colorare în masă. Timpii sînt dați pentru embrioni de șoarece de 16 zile: 1. hidroliză 75 min. cu HCl-n la temp. laboratorului, apoi 105 min. la 60°C; 2. spălare cu apă sulfuroasă 15—20 min.; 3. tratare 4—5 ore cu reactiv Schiff; 4 — spălare 16—18 ore cu apă sulfuroasă; 5. deshidratare cu alcool, clarificare cu xilol, includere în parafină.

Scanned with OKEN Scanner

2. Alte reacții nucleale diferă de metoda Feulgen-Rossenbeck, fie prin faptul că utilizează în locul reactivul Schiff echivalenții acestuia (pag. 120). fapt ce poate conferi, în unele cazuri, un avantaj de ordin optic sau prin faptul că evidențierea grupelor aldehidice eliberate prin hidroliză se face cu ajutorul altor reacții (fenilhidrazine, complexe alcaline de argint) care dau un produs colorat sau fluorescent.

Pentru tehnici utilizînd fenilhidrazine vezi **metoda Albert-Leblond** (pag. 123) iar pentru cele cu hidrazida acidului 2-hidroxi-3-naftoic vezi **metoda Ashbel-Seligman** (pag. 124).

Dintre reacțiile utilizînd echivalenți ai reactivului Schiff prezentăm:

Metoda De Lamater (cu tionină sau azur A). **Reactivi:** 1. sol. apoasă 0,25% de tionină (sau azur A) 10 ml; înainte de întrebuințare se adaugă o picătură de clorură de tionil (2 picături pentru azur A); soluția nu se conservă. Se procedează apoi exact ca pentru reacția Feulgen-Rossenbeck. Se poate face o supracolorare cu picrofucsina Van Gieson. **Rezultat:** ADN se colorează foarte contrast în albastru închis, iar mucopolizaharidele foarte acide se colorează și ele dar metacromatic.

Metoda Menzies (cu azur B-fucsină bazică). **Reactivi:** 1. sol. 10% de HCl-n în tetrahidrofuran; 2. sol. apoasă 1% azur B 15 ml, sol. apoasă 0,1% fucsină bazică 4 ml, ac. acetic glacial 1 ml. **Tehnica:** 1. fixare cu formol salin la pH 6, includere în parafină; 2. secțiuni deparafinate, colodinate, hidratate se hidrolizează la 37°C, timp de 2—3 min. în sol. 1; 3. colorare cu sol. 2 timp de 20 min.; 4. clătire cu apă dist., deshidratare etc. **Rezultat:** ADN se colorează în roșu, iar ANR în albastru.

Scanned with OKEN Scanner

Grupele aldehidice eliberate prin hidroliza acidă pot fi evidențiate și datorită funcției lor reducătoare asupra complexelor alcaline de argint.

Metoda Korson: 1. hidroliză cu sol. 1 M ac. citric la 60°C timp de 30 min.; 2. spălare cu apă dist. 5 min. apoi incubare în sol. arginthexametilentetramină (pag. 104) timp de 1 oră la 60°C; 3 clătire cu apă dist. și virare cu sol. 0,2% clorură de aur timp de 5 min; 4. clătire cu apă dist.; deshidratare, clarificare, montare. **Rezultat:** cromatina (ADN) se impregnează în negru. **Varianta Martino** utilizează hidroliza la cald cu HCl-n.

Alte tehnici se bazează pe proprietatea unor fluorocromi de a conferi acizilor nucleici o **fluorescență** caracteristică la examenul în ultraviolet.

Metoda Streba (cu N,N'-dietilpseudoizocianin-clorid). **Tehnica:** 1. fixare în Carnoy, includere în parafină; 2. secțiuni hidratate se tratează 6—7 ore la 40°C cu sol. 3% ac. sulfuric în alcool metilic; 3. trecere direct în sol.: 80 ml apă dist., 5 ml. sol. 2,5% permanganat de potasiu, 5 ml sol. 5% acid sulfuric; se lasă lamele aici 3 min.; 4. albire timp de 30 sec. cu sol. 3% ac. oxalic; 5. clătire cu apă dist., apoi spălare 30 min. cu apă curgătoare și sugativare cu hîrtie de filtru; 6. colorare 12—24 ore la temp. laboratorului cu sol.: 100 ml apă dist.; 50 mg N,N'-dietilpseudoizocianin-clorid; 7. clătire rapidă cu apă dist., montare în mediu nefluorescent, examen în ultraviolet cu filtre UG 1/15—OG 1. **Rezultat:** ADN se evidențiază printr-o fluorescență galbenă.

Metoda Bertalanffy cu acridin oranj. **Reactivi:** 1. tampon fosfat M/15 cu pH 6,0; 2. sol. 0,01%

Scanned with OKEN Scanner

acridin oranj în sol. 1; 3. sol. M/1 clorură de calciu (11,099 g la 100 ml apă dist.). **Tehnica:** 1. se aplică pe amprente sau frotiuri umede, fixate timp de 30 min. în sol. 1 : 1 alcool eter sau pe secțiuni la parafină din probe fixate în Carnoy; 2. hidratare gradată cu alcool 90°, 70°, 50° apoi apă dist.; 3. tratare 6. sec. cu sol. 1% ac. acetic, apoi spălare cu apă dist.; 4. colorare 3 min. cu sol. 2.; 5. spălare 1 min. cu sol. 1; 6. diferențiere 30 sec. cu sol. 3; 7. montare în sol. 1 și examen imediat în ultraviolet. **Rezultat:** ADN-fluorescență verde; ARN-fluorescență roșie-cărămizie.

Varianta Riva-Turner se utilizează în cazuri de urgență: 1. frotiuri sau amprente fixate sau nefixate se colorează 5 sec. într-o sol. apoasă 0,025 g% acridin oranj; 2. diferențiere 2 sec. în sol. 2% alcool etilic în ser fiziologic; 3. clătire și montare cu ser fiziologic. **Rezultat:** ca mai sus.

Observații: după un examen îndelungat în ultraviolet, fluorescența roșie slăbește și virează treptat spre culoarea verde. Metoda nu este aplicabilă după fixări cu formol.

Metoda Keeble-Jay cu corifosfin O. **Tehnica:** 1. se aplică pe amprente sau frotiuri umede fixate în Carnoy sau secțiuni din probe fixate în același fixator; 2. secțiuni hidratate se spală cu tampon fosfat pH 7,1 conținînd 0,2% fenol; 3. colorare în sol. 0,01% corifosfin-0 în tampon fosfat pH 7,1 timp de 5 min.; 4. spălare timp de 10 sec. cu tampon fosfat; 5. examen în mediu apos nefluorescent. **Rezultat:** ca în tehnica precedentă, cu deosebirea că fluorescența este mai persistentă.

Scanned with OKEN Scanner

D. METODE DE CONTROL PRIN EXTRACȚIA ACIZILOR NUCLEICI

S-a arătat în partea introductivă a acestui capitol că, exceptînd reacția nucleală, tehnicile prezentate nu pot fi considerate specifice pentru acizii nucleici decît dacă sînt verificate prin procedee de extracție selectivă a acestora. Se recurge în acest scop la metodele de digestie enzimatică sau, în lipsa preparatelor comerciale de enzime, la extracția prin procedee chimice.

1. EXTRACȚIA ENZIMATICĂ. EXTRACȚIA CU RIBONUCLEAZĂ

Această enzimă, în anumite condiții, atacă în mod specific macromoleculele de acid ribonucleic pe care le fragmentează în mono sau oligonucleotide dializabile, deci ușor de extras din secțiuni prin solvenți apoși. Preparatele comerciale existente în prezent sînt suficient de purificate pentru ca, aplicate corect, să avem siguranța unei acțiuni elective. O influență hotărîtoare în acest sens are fixarea. Unii fixatori ca lichidul Carnoy sau Clarke nu asigură o suficientă imobilizare a ribonucleinelor, așa încît acestea pot fi extrase ulterior prin solvenți apoși. Deci, în aceste cazuri, durata de acțiune a sol. enzimatice trebuie să fie mai scurtă. Alți fixatori și anume cei pe bază de formol, crom, acid picric și sublimat au o oarecare acțiune inhibitoare asupra enzimei, deci se impune în aceste cazuri o prelungire a timpului de acțiune a soluției enzimatice. În toate aceste cazuri se va asigura o cît mai perfectă spălare a fixatorului din probe și secțiuni.

Practic se procedează astfel: 1. secțiuni deparafinate, **necolodinate** și hidratate se tratează la tempe-

Scanned with OKEN Scanner

ratura de 37°C cu o sol. apoasă de ribonuclează în concentraţie de 1/100.000—1/10.000 (se va utiliza apă distilată în aparat de sticlă). O lamă martor se tratează în aceleaşi condiţii numai cu solventul, adică cu apă dist. Durata de acţiune va fi mai scurtă de 1 oră în cazul fixării cu Carnoy sau Clarke, 90 min. pentru Bouin, 3 ore pentru formol, sublimat, Zenker, Helly. După clătirea cu apă dist. se practică pe aceste lame şi în plus pe una recent deparafinată, reacţia sau coloraţia aleasă pentru evidenţierea ARN. Prezenţa ARN poate fi afirmată atunci cînd reacţia se produce pe lame netratate şi este complet negativă pe cele tratate cu ribonuclează. Lama tratată doar cu apă dist. ne poate indica eventualele pierderi de ARN prin simplă dizolvare.

Extracţia cu dezoxiribonuclează este mai puţin utilizată, pe de o parte pentru că reacţia nucleală nu necesită de regulă acest control, pe de altă parte pentru că preparatele de ADN-ază sînt mai greu de obţinut în stare pură şi preţul lor este foarte ridicat. Aplicarea probei de extracţie cu ADN-ază se pretează mai ales după fixările cu alcool-ac. acetic. Practic se procedează astfel: secţiuni deparafinate, **necolodinate** şi hidratate se tratează 3—6 ore, la 37°C cu o sol. de ADN-ază cristalizată în concentraţie de 0,05—0,1 mg/ml. Solventul este o sol. tampon Veronal 25 mM cu pH 7,5 (sau tampon tris Gomori pH 7,6 sau fosfat cu pH 7). Se adaugă ca activator sulfat de magneziu în conc. 0,2 M sau clorură de magneziu în conc. de 0,003 M. Acţiunea enzimei se opreşte cu apă dist. după care se practică deshidratarea cu alcool, alcool-eter, colodinare şi la urmă reacţia nucleală sau altă reacţie pentru ADN.

Scanned with OKEN Scanner

2. PROCEDEE DE EXTRACȚIE CHIMICĂ

Aceste procedee sînt mai puțin costisitoare decît cele enzimatice, în schimb electivitatea lor nu este suficient de sigură.

Extracția globală a ADN și ARN se poate realiza cu: 1. sol. 5% acid tricloracetic timp de 15 min. la 90°C; 2. sol. HCl-n timp de cel puțin 60 min. la 60°C; 3. sol. 10% acid percloric timp de 20 min. la 70°C.

Aceste extracții se mai pot practica atunci cînd cercetăm anumite substanțe bazofile, ca de exemplu unele mucopolizaharide și vrem să evităm suprapunerea bazofiliei acizilor nucleici.

Extracția separată a ARN se poate realiza cu: 1. sol. HCl-n timp de 3—10 min. la 60°C; sol. 10% acid percloric timp de 12—18 ore la +4°C; 3. sol. 2 M de acid azotic, clorhidric sau sulfuric timp de 16—24 ore la 0—4°C; 4. tampon fosfat Sörensen cu pH 6,75 timp de 45 min. la 56°C; 5. tampon tris 0,05 M Gomori cu pH 7,5 timp de 2 ore la 56°C.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL VII

ENZIMELE

A. IMPORTANȚA ȘI ROLUL REACȚIILOR HISTOENZIMATICE

Prin reacții histoenzimatice se pun în evidență în preparate histologice, prezența și variația activității unor enzime. Trebuie făcută de la început delimitarea între evidențierea (decelarea) unei enzime, care se face prin metode biochimice și evidențierea sau decelarea unei „activități enzimatice" care se face prin metode histotopochimice.

Importanța reacțiilor histoenzimatice se datorește faptului că ele permit o localizare la nivelul structurilor histologice a diferitelor activități enzimatice, respectiv o histotopochimie foarte utilă astăzi în toate domeniile biologiei și medicinii. Astfel se poate preciza existența, desfășurarea și intensitatea diferitelor metabolisme celulare și tisulare. Se cunosc astăzi peste 800 de enzime care participă la diferitele metabolisme: dintre acestea aproximativ 50 de enzime pot fi identificate prin diferite metode histoenzimatice.

Datorită numărului foarte mare de enzime și mai ales pentru sistematizarea cercetărilor și interpretărilor științifice, U.I.B. (Uniunea Internațională de

Scanned with OKEN Scanner

Biochimie) a stabilit încă din anul 1962 o „clasificare internațională a enzimelor", numind în acest scop o „comisie de enzime" (EC). În acest îndrumător de tehnici histochimice, metodele histoenzimatice sînt prezentate în funcție de numărul de ordine EC precizat pentru fiecare enzimă.

Se recomandă ca cercetările de histoenzimologie să se desfășoare în paralel cu cercetările de biochimie enzimatică, astfel încît prin coroborarea rezultatelor să se obțină date științifice cît mai reale și mai complexe asupra diferitelor metabolisme intermediare.

În medicina umană și în cea veterinară, reactiile histoenzimatice încep să fie folosite în scop de diagnostic și prognostic al unor dismetabolii și sînt introduse în protocolul experimental de farmacodinamie.

B. PRINCIPIILE EVIDENȚIERII HISTOTOPOCHIMICE A ACTIVITĂȚII ENZIMELOR

Spre deosebire de reacțiile de biochimie enzimatică, cele de histochimie enzimatică sînt mult mai dificil de realizat. De aceea un histoenzimolog trebuie să fie deopotrivă, atît histolog cît și biochimist.

După cum s-a arătat, prin metode histoenzimatice se pune în evidență o „activitate enzimatică" și nu o anumită enzimă. În acest fel, metodele histoenzimatice pun în evidență existența produsului de reacție rezultat prin acțiunea unei anumite enzime asupra unui anumit substrat, conform schemei:

$$\underset{\text{(enzimă)}}{E} + \underset{\text{(substrat)}}{S} \rightleftharpoons \underset{\text{(produs de reacție)}}{ES}$$

Scanned with OKEN Scanner

Cazul ideal din punct de vedere histoenzimatic este ca produsul ES să fie **insolubil,** pentru a nu difuza de la locul în care s-a produs reacţia histoenzimatică şi **colorat,** pentru a putea fi observată microscopic prezenţa lui.

Un principiu general al evidenţierii histotopochimice a enzimelor îl constituie **adăugarea substratului** specific la mediul de incubaţie; existenţa substratului în exces face să se mărească viteza de reacţie în sensul formării produsului ES, chiar dacă enzima E se află în cantităţi scăzute. Se preferă de obicei substraturile naturale ale diferitelor enzime. Există însă din acest punct de vedere unele inconveniente în precizarea şi interpretarea unor reacţii histoenzimatice, deoarece există cazuri cînd mai multe enzime descompun acelaşi substrat şi invers, mai multe substraturi pot fi descompuse de o singură enzimă.

Problema **insolubilizării produsului de reacţie ES** a preocupat şi preocupă mereu pe histoenzimologi. Se ştie din biochimia clasică, că enzimele prezintă 2 fracţiuni şi anume o fracţiune hidrosolubilă numită **lioenzimă** şi alta liposolubilă numită **desmoenzimă.** Este evident că prin reacţiile histoenzimatice se pot evidenţia aproape numai desmoenzimele, deoarece lioenzimele se pierd în timpul diferitelor manopere de obţinere a preparatului histoenzimatic.

Dacă produsul de reacţie ES este solubil, aşa cum se întîmplă în cazul hidrolazelor, atunci el se transformă în produs insolubil prin aşa-numita **„captură".** Dacă produsul hidrolizei enzimatice este un anion (fosfat, carbonat), el devine insolubil, prin captura cu ioni metalici (calciu sau plumb). Dacă prin hidroliză enzimatică se eliberează un produs naftolic solubil, el devine insolubil prin „captură cu o sare de

Scanned with OKEN Scanner

diazoniu“ ca de exemplu în metodele cuplajului simultan (Seligman și col., Burstone și col.) în care se folosesc ca substraturi diferiți derivați naftolici.

Vizualizarea produsului de reacție ES se face prin adăugarea la mediul de incubație sau în unele cazuri după incubație, a unor substanțe **cromogene,** care permit observarea la microscop a prezenței și intensității tinctoriale a reacției enzimatice. În funcție de diferitele clase de enzime și chiar de diferite enzime, există numeroase substanțe cromogene, al căror mecanism de acțiune este de asemenea diferit. Sînt foarte utilizate în acest scop sărurile de tetrazoliu.

Sărurile de tetrazoliu reduse se transformă în diferiți **formazani,** care sînt substanțe **cromofore** și insolubile în apă.

Vizualizarea enzimelor hidrolitice necesită de asemenea folosirea unor substanțe cromogene și respectiv cromofore. Astfel, de exemplu, în metoda capturii printr-o sare de diazoniu, aceasta este și substanța cromogenă (care s-a arătat că asigură în același timp și insolubilizarea produsului de hidroliză enzimatică); din această captură rezultă un **colorant azoic,** care este substanța cromoforă ce permite vizualizarea reacției enzimatice. Dacă cuplarea cu o sare de diazoniu se face numai pentru vizualizare (nu și pentru insolubilizare), așa cum se întîmplă în cazul cînd produsul de hidroliză enzimatică este un compus naftolic insolubil, atunci adăugarea sării de diazoniu se face după incubarea secțiunii, rezultînd în acest fel **„metoda de postcuplare“.**

Realizarea vizualizării diferitelor reacții histoenzimatice cu ajutorul unor substanțe cromogene și cromofore reprezintă însă și surse de artefacte, atît

Scanned with OKEN Scanner

sub aspectul localizării activității enzimatice (artefact histotopochimic), cît și sub aspectul intensității tinctoriale (artefact cantitativ).

C. ETAPELE EFECTUĂRII PREPARATULUI HISTOENZIMATIC

Principalele etape ale obținerii preparatului histoenzimatic sînt în parte asemănătoare cu cele din histologia clasică (recoltarea, fixarea, secționarea și montarea), dar prezintă 2 etape specifice și anume incubarea și vizualizarea. Deși numărul de etape, timpii de lucru și mai ales durata manoperei, sînt mai reduse la tehnicile histoenzimatice comparativ cu tehnicile histomorfologice, totuși realizarea lor practică este mult mai dificilă.

Dintre greutățile pe care le considerăm obiective menționăm necesitatea unei aparaturi speciale (de exemplu, criotom), precum și a unor reactivi costisitori.

Recoltarea. Spre deosebire de reacțiile histomorfologice și chiar de cele histochimice, reacțiile histoenzimatice se pot face numai pe fragmente de țesuturi recoltate „in vivo" (prin biopsie) sau la foarte scurt timp după sacrificarea animalelor de experiență. De aceea, probele recoltate după autopsii nu sînt utilizabile pentru evidențierea histotopochimică a activității enzimatice.

Recomandăm ca după recoltare, fragmentele de țesuturi și organe prelevate pentru cercetări histoenzimatice să fie imersate în izopentan răcit cu azot lichid, în containere speciale.

Scanned with OKEN Scanner

Aceasta permite o înghețare completă, la —196°C, a fragmentului recoltat, cu toate consecințele prezentate la pag. 39.

Fixarea. Problema fixării țesuturilor sau chiar a secțiunilor folosite pentru reacții histoenzimatice este astăzi controversată, întrucît în mod teoretic fixarea trebuie să realizeze simultan două deziderate și anume, fixarea topochimică a enzimei și fixarea structurilor citohistologice. În mod practic, realizarea acestor două deziderate este foarte dificilă, deoarece asigurarea condițiilor pentru realizarea uneia din fixări o „incomodează" pe cealaltă.

În histoenzimologie există trei situații în raport cu fixarea:

a) **Folosirea de țesuturi nefixate,** mai ales în cazul diferitelor reacții de evidențiere topochimică a activității unor oxidoreductaze (de exemplu, succindehidrogenază). Secționarea directă la microtomul cu congelare a țesuturilor proaspăt recoltate și trecerea secțiunilor direct în mediul de incubație se practică în cazul cînd activitatea enzimatică a oxidoreductazelor este crescută, difuziunea lor redusă prezentînd posibilități de vizualizare fără alte manopere suplimentare. Pe bună dreptate s-a remarcat că în histoenzimologia oxidoreductazelor și chiar a unor hidrolaze este mai bine să se lucreze direct cu preparatul nativ.

b) **Folosirea de țesuturi fixate** cu diferite substanțe fixatoare utilizate în histologia clasică (pag. 22).

O regulă generală în cazul fixărilor pentru cercetări histoenzimatice este ca fixarea să se facă la rece, respectiv în frigider la temperatura de 0—4°C, timp de 18—24 ore. Prelungirea duratei fixării peste

Scanned with OKEN Scanner

acest timp creează posibilitatea unor artefacte prin difuzia enzimei și scăderea activității enzimatice.

Folosirea fixatorilor histologici se impune în cazul detectării histochimice a majorității enzimelor din clasa hidrolazelor, care sînt mult mai ușor difuzibile și conțin cantități mai mari de lioenzime (respectiv hidrosolubile). De asemenea, folosirea fixatorilor histologici și mai ales a glutaraldehidei se impune în cazul cercetărilor de histoenzimologie electronomicroscopică, pentru ca activitățile enzimelor să rămînă fixate la nivelul diferitelor organite celulare.

c) **Folosirea de țesuturi postfixate,** după secționare prin congelare. Se utilizează acetona sau amestecuri de formol de la frigider (0—4°C). Avantajul acestei postfixări este acela că fixatorii pătrund mult mai repede.

Secționarea. Pentru obținerea unor preparate histoenzimatice cît mai bune, se recomandă în primul rînd secționarea la criotom. Tehnica propriu-zisă a secționării la criotom a fost prezentată la pag. 35.

Pentru cercetări histoenzimatice de rutină se poate folosi și secționarea la microtomul cu congelare, fie modelul clasic cu bioxid de carbon, fie modelele mai recente cu termoelementi.

În unele situații particulare, pentru realizarea de preparate histoenzimatice se folosesc și secțiuni la microtomul cu parafină.

Incubarea. Incubarea reprezintă cea mai importantă etapă din tehnica unui preparat histoenzimatic.

Scopul principal al incubării este de a oferi enzimei care urmează a fi decelată, un substrat îmbogățit artificial, prin adăugarea la mediul de incubație

Scanned with OKEN Scanner

a substratului adecvat enzimei respective. Aceasta se face pentru a grăbi foarte mult ritmul și gradul de formare a produsului ES (enzimă-substrat) care, după cum s-a arătat, reprezintă de fapt activitatea enzimatică. Un alt scop al incubării este acela de a face insolubil produsul de reacție ES, în cazul cînd acesta nu este direct insolubil. În foarte multe cazuri (de exemplu la hidrolaze) este necesară această insolubilizare indirectă. Un al treilea scop al incubării este acela întîlnit în cazul particular al unor tehnici enzimatice, în care odată cu asigurarea insolubilizării produsului ES prin „captură cu o sare de diazoniu" se realizează și formarea unui colorant azoic, care este o substanță cromoforă, respectiv permite vizualizarea activității enzimatice după incubare. Pentru realizarea acestor 3 scopuri, mediul de incubare cuprinde în general următoarele:

— substratul specific (natural sau sintetic) al enzimei care urmează a fi decelată;

— substanța care asigură insolubilizarea produsului de reacție (în cazul cînd acesta nu este direct insolubil);

— substanța care asigură în timpul incubației (și nu ulterior ca în majoritatea cazurilor) vizualizarea activității enzimatice.

O regulă importantă este aceea ca mediul de incubație, în general și mai ales adăugarea substratului specific să se facă numai în momentul utilizării lui pentru incubație.

Întotdeauna se va acorda o atenție deosebită **pH**-ului mediului de incubație, deoarece se știe că o caracteristică importantă a activității enzimelor o constituie cerința lor pentru un anumit pH optim de acțiune. Mediul de incubație trebuie să fie în stare de normotonie sau mai bine chiar hipertonie față de

Scanned with OKEN Scanner

celulele secțiunii incubate, pentru a preveni ruperea plasmalemei și difuzarea enzimelor în mediul de incubație. De obicei, prin respectarea cantităților diferitelor componente ale mediului de incubație se realizează și **presiunea osmotică** necesară desfășurării în bune condiții a reacției histoenzimatice.

O particularitate importantă a incubației o constituie **timpul de incubație.** Prin calcule matematice și experimente biochimice s-a constatat că saturarea enzimei cu substratul ei în timpul unei incubări de 20 minute se face în cantități suficiente pentru a fi vizualizată microscopic.

Se recomandă ca timpul de incubație să fie tatonat în fiecare cercetare histoenzimatică, stabilindu-se un timp optim pentru o anumită situație (un anumit țesut, organ, o anumită stare fiziologică sau patologică etc.).

VIZUALIZAREA. Prin vizualizarea enzimelor, mai corect a activității enzimatice a acestora se înțelege observarea la microscop a unei culori anumite, cu aspect granular sau difuz, care indică în principiu locul activității enzimatice **(aspectul histotopochimic al vizualizării)** și prezintă o anumită intensitate tinctorială, care indică, în principiu, intensitatea activității enzimei respective **(aspectul de histoenzimologie cantitativă al vizualizării).**

După cum este și firesc, enzimele nu se pot „vedea" direct, astfel încît vizualizarea lor presupune realizarea unor reacții chimice speciale. Produsul de reacție enzimatică ES poate fi vizualizat direct (în cadrul dehidrogenazelor) sau indirect (în cazul majorității hidrolazelor).

În esență, pentru vizualizarea activității enzimatice, produsul de reacție ES trebuie să fie în primul rînd o **substanță cromogenă** (care să genereze

Scanned with OKEN Scanner

direct sau indirect o culoare) și în cel mai bun caz să fie în același timp și o **substanță cromoforă** (care reprezintă deja o culoare decelabilă). Dacă produsul de reacție ES nu este simultan și cromogen și cromofor, atunci substanța cromogenă inițială devine cromoforă prin reacție cu o altă substanță, după cum se va prezenta în cazul fiecărei tehnici histoenzimatice. În continuare se vor prezenta pe scurt principiile de vizualizare ale unor enzime din clasa oxidoreductaze și din clasa hidrolaze.

Vizualizarea directă a produsului de reacție enzimatică ES are loc în cazul majorității oxidoreductazelor, cînd se folosesc ca substrat sărurile de tetrazoliu. Ele au proprietatea de a fi acceptori de hidrogen (care se eliberează în timpul reacției catalizată enzimatic). Acceptarea hidrogenului se poate face direct de la substrat sau indirect, cu ajutorul coenzimelor de tipul NAD și NADP. Prin cedarea de hidrogen, substratul mediului de incubație se reduce, astfel încît din **sarea inițială de tetrazoliu devine formazan colorat.** În decursul evoluției tehnicilor histoenzimatice s-au utilizat diferite săruri de tetrazoliu, diferențiabile între ele prin **potențialul redox,** prin solubilitate și prin mărimea granulelor de formazan (tabelul 8).

Vizualizarea indirectă a produsului de reacție enzimatică ES eliberat prin hidroliză se face prin două metode și anume: metoda captării și metoda oxidării; la rîndul ei, captarea este de două feluri și anume: „captare cu ioni de metal" și „captare prin săruri de diazoniu".

a) **Captarea cu ioni de metal** reprezintă modalitatea prin care un anion (fosfat, carbonat etc.) eliberat prin reacție de hidroliză enzimatică, este trans-

Scanned with OKEN Scanner

format într-un produs insolubil, care să rămînă la locul reacției. De exemplu in cazul fosfatazelor, prin hidroliza enzimatică se eliberează anionul fosfat, care este precipitat prin „captare" de către cationi și anume: Ca^{++} pentru fosfataza alcalină și Pb^{++} pentru fosfataza acidă. Acești **„cationi de captare"** se adaugă mediului de incubație sub formă de clorură da calciu ($CaCl_2$) și respectiv azotat de plumb ($Pb/NO_3/_2$). În timpul incubației, prin hidroliză, se formează anionul fosfat, care cu cationul de captare va precipita sub formă de fosfat acid de calciu ($CaHPO_4$) și respectiv fosfat de plumb ($Pb_3/PO_4/_2$). Aceste substanțe sînt însă albe, deci practic nu pot asigura vizualizarea la microscopul optic. De aceea, la mediul de incubație se adaugă sulfura de amoniu $(NH_4)_2S$ care va forma în cazul fosfatazei acide sulfură de plumb. Aceasta este deja o substanță cromoforă, de culoare brună-închis, care poate fi vizualizată microscopic și indică histotopochimic activitatea enzimatică a fosfatazei acide. În cazul fosfatazei alcaline, dacă s-ar forma sulfura de calciu, aceasta este tot albă, deci fără posibilități de vizualizare încît la mediul de incubație trebuie să se adauge azotat de cobalt $Co(NO_3)_2$ în exces, care va transforma fosfatul acid de calciu în fosfat de cobalt și apoi acesta cu ajutorul sulfurii de amoniu $(NH_4)_2S$ se transformă în sulfură de cobalt (CoS) care este o substanță cromoforă, de culoare neagră.

b) **Captarea prin săruri de diazoniu** (tabelul 3) este o metodă introdusă mai recent în tehnicile de evidențiere histotopochimică a activității enzimatice a unor hidrolaze și are ca principiu folosirea unui naftol care prin hidroliză enzimatică eliberează un compus naftolic. În funcție de solubilitatea acestui

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 8

Principalele săruri de tetrazolium utilizate în histochimie (după Burstone)

Denumirea chimică	Denumirea comercială și prescurtarea
a) Clorură de 2,3,5-triphényl-tetrazolium	Triphenyltetrazolium (TTC)
b) Clorură de 2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium	Iodonitrotetrazolium (INT)
c) Bromură de 3- (4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium	Methylthiazolyltetrazolium (MTT)
d) Clorură de (4,4′-diphenylene)-bis-2-(3,5-diphenyl) tetrazolium	Neotetrazolium (NT)
e) Clorură de 3,3′-dianisol-bis-4,4′-(3,4) diphenyltetrazolium	Blue tetrazolium (BT)
f) Clorură de 2,2′-di-p-nitrophenyl-5,5′-diphenyl-(3,3′-dimethoxy-4,4′-bi-phenylene) ditetrazolium	Nitro Blue tetrazolium (NBT)
g) 2,2′, 5,5′-tetra-p-nitrofenil-3,3-(3,3-dimetoxi-4,4-biphenylen)-ditetrazoliumchlorid	Tetranitro-BT (TNBT)

compus naftolic există următoarele două posibilități:

— compusul naftolic este solubil și printr-o reacție de **cuplare simultană,** sarea de diazoniu (care se află în mediul de incubație) dă naștere la un **colorant azoic,** care este o substanță cromoforă ce permite vizualizarea activității enzimei respective;

Scanned with OKEN Scanner

Greutatea molec.	Conc. în medii de incubare	Culoarea	Solubilitatea	Mărimea particul. precip.	Stabilitatea la reoxidare
334,81	0,5 mg/ml	Roşie	+	F. mare	0
541,18	0,5 mg/ml	Roşu-violet	+	Mare	0
414,35	0,5 mg/ml	Negru	±	Fină	0
703,65	1 mg/ml	Roşu şi violet	+	Variabilă	+
727,67	1 mg/ml	Roşu şi violet	+	Variabilă	+
871,72	0,5 mg/ml	Albastră	±	Foarte fină	0
907,65	0,25 mg/ml	Roşu-brun	—	Extrem de fină	0

— compusul naftolic este insolubil şi numai după terminarea incubării secţiunea se trece într-o baie care conţine o sare de diazoniu, avînd loc o **reacţie de postcuplare,** în urma căreia apare un colorant azoic care este, după cum s-a arătat, o substanţă cromoforă.

Majoritatea tehnicilor histoenzimatice se bazează pe principiile reacţiilor schematizate anterior; există

Scanned with OKEN Scanner

și alte mecanisme particulare în cazul peroxidazelor, citocromoxidazei etc.

Montarea. În general, preparatele histoenzimatice se montează în medii hidrosolubile (pag. 72), deoarece majoritatea produselor de reacție sînt solubile în alcool și benzen. Astfel, cînd produsul de reacție este o sare redusă de tetrazoliu (formazan) sau un colorant azoic obținut prin cuplare cu o sare de diazoniu, montarea are loc într-un mediu hidrosolubil. Există însă și situații particulare. De exemplu, în cazul sării de diazoniu Fast Blue B (diazo-0-dianizidină) colorantul azoic este rezistent față de alcool, acetonă și benzen, încît montarea poate fi făcută într-un mediu anhidru. În cazul întrebuințării naftolului AS, montarea are loc întotdeauna într-un mediu hidrosolubil. Azocuplarea cu o sare de hexazoniu dă un produs care poate fi montat deopotrivă în medii hidrosolubile și anhidre.

Cînd din reacția histoenzimatică rezultă sulfură de plumb, de cupru sau de cobalt, un derivat chinonic sau melanină, montarea poate fi executată într-un mediu anhidru.

D. SPECIFICUL INTERPRETĂRII REACȚIILOR HISTOENZIMATICE

Există mai multe situații sub aspectul interpretării microscopice a unui preparat histoenzimatic și anume:

a) **Reacție pozitivă,** adică reacția enzimatică este vizualizată, observîndu-se microscopic culoarea specifică pentru evidențierea histotopochimică a activității enzimei decelate. Există două tipuri de reacții pozitive și anume:

Scanned with OKEN Scanner

— **Reacţie normal pozitivă,** în care decelarea microscopică a culorii specifice înseamnă **prezenţa** activităţii enzimatice în locul respectiv, iar intensitatea tinctorială indică **variaţia** activităţii enzimei respective. În principiu se consideră că prezenţa şi variaţia intensităţii tinctoriale a preparatului histoenzimatic reflectă indirect prezenţa şi variaţia produsului de reacţie al activităţii enzimei care a fost decelată.

— **Reacţie fals pozitivă** în care decelarea microscopică a culorii specifice nu înseamnă prezenţa reală a activităţii enzimatice la locul respectiv. Există în principiu două categorii de reacţii fals pozitive. Astfel, prima categorie constă în difuzarea enzimei de la locul unde ea se găseşte în mod normal. Această difuzare a enzimei către alt loc se poate datora solubilizării ei în mediul de incubaţie şi precipitării ulterioare a produsului ei în alt loc de reacţie decît cel normal, mai ales cînd fracţiunea lioenzimei este în cantitate mai mare sau timpul de incubaţie este mai îndelungat.

Cealaltă categorie de reacţie fals pozitivă este dată de formarea unor granule de substanţă cromoforă în mod artificial şi nu datorită mersului normal al mecanismului de vizualizare al reacţiei histoenzimatice.

Pot exista şi **precipitate nespecifice,** care în realitate nu au fost produse prin reacţia histoenzimatică normală ci de exemplu prin hidroliza esterilor fosfat, datorită ionului Pb^{++}. În acest caz Pb^{++} poate să hidrolizeze spontan ATP-ul din mediul de incubaţie şi să simuleze hidroliza enzimatică a ATP-azei; pentru evitarea acestui neajuns, în unele reacţii histoenzimatice, se adaugă la mediul de in-

Scanned with OKEN Scanner

cubație EDTA, care împiedică această hidroliză neenzimatică.

b) **Reacție negativă,** adică la microscop nu se vizualizează reacția de culoare specifică tehnicii respective. Există și în acest caz două situații și anume:

— **Reacție normal negativă,** în care absența culorii specifice a substanței cromofore se datorește lipsei unei activități enzimatice minime pentru a fi vizualizată. Cu alte cuvinte, o reacție normal negativă, nu înseamnă că în celulele sau țesuturile examinate, activitatea enzimei urmărite este absentă, ci numai că prin metoda respectivă (la care întotdeauna are o mare importanță concentrația substratului și timpul de incubare), nu a putut fi decelată histotopochimic, ea putînd însă să existe din punct de vedere biochimic.

— **Reacție fals negativă,** în care absența culorii specifice a substanței cromofore nu înseamnă lipsa unei activități enzimatice decelabilă prin metoda respectivă, ci o inhibare totală sau parțială a activității enzimei în timpul diferitelor manopere de obținere a preparatului histoenzimatic.

Datorită sensibilității foarte ridicate pe care o are activitatea enzimatică față de cele mai mici modificări ale mediului și datorită manoperelor la care este supusă secțiunea histologică pînă devine preparat histoenzimatic, există posibilitatea apariției de **artefacte,** care în histoenzimologie sînt mult mai frecvente comparativ cu histomorfologia. Reacțiile fals pozitive și cele fals negative fac parte de fapt tot din cadrul „artefactelor histoenzimatice". Există de asemenea artefacte histoenzimatice tipice, care constau din precipitate mari ale substanței cromo-

Scanned with OKEN Scanner

fore, cauzate de diferite greşeli de tehnică sau de reactivi necorespunzători.

Un rol important în cadrul interpretării reacţiilor histoenzimatice îl au „preparatele de control" şi „preparatele martor".

a) **Preparatele de control** sînt acelea în care prin diferite procedee se exclude sau se inhibă activitatea enzimatică şi anume:

— **excluderea activităţii enzimatice** dintr-o secţiune histologică, prin lipsa substratului specific în mediul de incubare, respectiv preparatul de control trece prin aceleaşi manopere ca şi preparatul principal, cu excepţia faptului că în timpul incubării nu se mai formează produsul ES, astfel încît reacţiile vor fi totdeauna reacţii normal negative;

— **inhibarea activităţii enzimatice** dintr-o secţiune histologică, prin utilizarea de inhibitori specifici în mediul de incubaţie sau prin tratare termică (la 60°C) înainte de incubare. În ambele situaţii, de obicei apar reacţii normal negative. În unele situaţii particulare pot apărea reacţii fals-pozitive foarte slabe, în cazul cînd inactivarea a fost insuficientă sau cînd produsul ES s-a aflat de la început în secţiunea histologică. Utilizarea de inhibitori specifici este destinată mai ales pentru cercetările ştiinţifice, de verificare şi elaborare a unor noi tehnici histoenzimatice. Pentru lucrări de rutină se recomandă mai ales efectuarea de preparate de control, prin excluderea activităţii enzimatice.

b) **Preparatul martor** constă în efectuarea unor secţiuni histologice dintr-un organ sau ţesut foarte bine cunoscut sub aspectul histotopo-

Scanned with OKEN Scanner

chimiei activităţii enzimatice, care se prelucrează în acelaşi mod şi în aceleaşi soluţii (mai ales în acelaşi mediu de incubare) cu secţiunile histologice din organul sau ţesutul care trebuie analizat.

În situaţia cînd secţiunile de analizat provin de la cazuri patologice, recomandăm ca preparatul martor să se facă din acelaşi organ sau ţesut al unui caz fiziologic.

O altă problemă importantă din punct de vedere practic în cadrul interpretării preparatului histoenzimatic o constituie opţiunea între reacţia histoenzimatică pură şi preparatul histoenzimatic supracolorat, pentru evidenţierea paralelă a unor detalii de structură histologică. Se recomandă ca preparatul histoenzimatic să rămînă fără supracolorarea nucleilor sau a altor formaţiuni, deoarece fiecare nouă manoperă efectuată asupra secţiunilor reprezintă o nouă sursă posibilă de artefacte şi de modificare cantitativă a intensităţii reacţiei.

Se recomandă ca întotdeauna concluziile cu caracter metabolic obţinute din cercetări histotopochimice să fie coroborate şi cu datele de biochimie analitică.

Un ultim aspect al interpretării preparatului histoenzimatic îl constituie necesitatea de a se efectua microfotografii (mai ales color, cînd substanţa cromoforă se pretează la aceasta). Aceste microfotografii trebuie efectuate cît mai curînd după obţinerea preparatului, deoarece intensitatea reacţiei se poate modifica în timp. În unele cazuri, preparatele care nu au putut fi fotografiate imediat se pot păstra în frigider la 0—4°C timp de cîteva ore.

Scanned with OKEN Scanner

E. METODE PENTRU CLASA OXIDOREDUCTAZE

1. DEHIDROGENAZE NAD — ȘI NADP — DEPENDENTE

Alcooldehidrogenaza (E.C. 1.1.1.1.).
Alfa-glicerofosfat-dehidrogenaza (E.C. 1.1.1.8.).
Lactatdehidrogenaza (E.C. 1.1.1.27.).
Malatdehidrogenaza (E.C. 1.1.1.37.).
Izocitratdehidrogenaza (E.C. 1.1.1.41.).
Glucozo-6-fosfat-dehidrogenaza (E.C. 1.1.1.49.).
Glutamatdehidrogenaza (E.C. 1.4.1.2.) ș.a.

METODA HESS-SCARPELLI-PEARSE PENTRU DEHIDROGENAZE NAD- ȘI NADP- DEPENDENTE. **Principiul metodei.** Dehidrogenazele menționate mai sus eliberează hidrogenul din substratul specific; acesta este acceptat de către o sare de tetrazoliu, care se reduce astfel în formazan insolubil și colorat. Dintre sărurile de tetrazoliu se folosește, în funcție de caz, nitro BT, tetranitro BT sau MTT. Se adaugă cianură de sodiu, azidă de sodiu (NaN_3) sau amital, cu rol de a inhiba respirația tisulară. **Reactivi și soluții necesare.** 1. Mediu de incubare compus din 0,1 ml substrat 1,0 M; 0,1 ml soluție NAD (nicotinamid-adenin-dinucleotid) sau NADP (nicotinamid-adenin-dinucleotid-fosfat) 0,1—1,0 M; 0,1 ml inhibitor al respirației (cianură de sodiu, azidă de sodiu sau amital) 0,1 M cu pH 7,2; 0,1 ml clorură de magneziu 0,05 M; 0,25 ml tampon (tampon fosfat 0,06 M sau tampon tris 0,2 M); 0,25 ml soluție 0,1% de sare de tetrazoliu; 0,1 ml apă distilată și 75 mg polivinil-pirolidon (cu masa moleculară 11 000). Toate soluțiile componente (în afară de inhibitorul respirației) se aduc la pH 7,0 și se păstrează la frigider. Soluția de NAD și NADP se păstrează la —20°C. **Tehnica**

Scanned with OKEN Scanner

de lucru: 1. Se foloseşte material proaspăt secţionat la criotom sau la microtomul cu congelare. Secţiunile se aplică pe lame. 2. Se acoperă cu mediul de incubare şi se lasă descoperite timp de 5—30 minute, la 37°C. 3. Se spală rapid în acid clorhidric 0,1 M. 4. Se fixează 10 minute în formol-calciu sau în formol neutru 10%. 5. În cazul metodelor care folosesc nitro BT, secţiunile se spală 10 minute în alcool de 10°, ceea ce reduce sau îndepărtează componenta roşie a culorii. 6. Se montează într-un mediu hidrosolubil. **Preparatul de control** se obţine prin incubare într-un mediu fără substrat. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în albastru-închis (nitro BT), roşu-brun (tetranitro BT) sau negru (MTT). **Observaţii:** 1. Pentru majoritatea cazurilor este suficientă o concentraţie 0,1 M a soluţiei de NAD sau NADP. 2. Se poate efectua o supracolorare a nucleilor.

Mediul de incubare pentru diferitele dehidrogenaze conţine pe lîngă clorura de magneziu, apă distilată şi polivinilpirolidon următoarele soluţii:

Alcooldehidrogenaza: alcool etilic (substratul), NAD, cianură de sodiu, tampon fosfat şi nitro BT.

Alfa-glicerofosfat-dehidrogenaza: DL-alfa-glicero-fosfat de sodiu neutralizat cu acid clorhidric 0,1 N (substratul), NAD, cianură de sodiu, tampon tris şi nitro BT.

Lactatdehidrogenaza: DL-lactat de sodiu (substratul), NAD, cianură de sodiu, tampon fosfat şi nitro BT sau tetranitro BT. Lactatul de sodiu 1 M se poate prepara dintr-o soluţie de acid lactic 1 M care se neutralizează cu hidroxid de sodiu 10%.

Scanned with OKEN Scanner

Malatdehidrogenaza: L-malat de sodiu sau acid L-malic ajustat cu tampon tris la pH 7,0 (substratul), NAD sau NADP, cianură de sodiu, tampon fosfat și nitro BT. Malatul de sodiu 1 M se poate obține dintr-o soluție de acid malic 1 M care se neutralizează cu hidroxid de sodiu 0,1 N.

Izocitratdehidrogenaza: acid DL-izocitric ajustat cu tampon la pH 7,0 (substratul), NAD sau NADP, cianură de sodiu, tampon fosfat și nitro BT sau tetranitro BT.

Glucozo-6-fosfat-dehidrogenaza: glucopiranozo-6-fosfat, sare de potasiu, calciu sau sare sodică (substratul), NADP, azidă de sodiu sau amital, tampon tris și MTT. La mediul de incubare se mai adaugă clorură de cobalt 0,05 ml soluție 0,5 M și florură de sodiu 0,05 ml soluție 0,01 M. La mediul de montare (glicerină-gelatină) se adaugă acetat de cobalt 0,5 M.

Glutamatdehidrogenaza: L-glutamat de sodiu monohidratat (substratul), NAD sau NADP, cianură de sodiu, tampon fosfat și nitro BT.

2. GLUCOZO-6-FOSFAT-DEHIDROGENAZA (E.C. 1.1.1.49)

METODA HESS-SCARPELLI-PEARSE VARIANTA RUDOLPH-KLEIN.

Principiul metodei a fost expus în varianta originală. **Reactivi și soluții necesare.** 1. Mediu de incubare format din 50 ml tampon tris-HCl 0,2 M cu pH 7,4; 150 mg glucozo-6-fosfat sare sodică; 160 mg NADP; 10 mg sare tetrasodică a acidului etilendiaminotetraacetic și 15 mg tetranitro BT. **Tehnica:** 1. Se folosește material proaspăt secționat la rece. 2. Se introduc secțiunile pînă la 40 minute, la 37°C, în mediul de incubare. 3. Se spală cu apă distilată, 2 băi a 2 minute. 4. Se clă-

Scanned with OKEN Scanner

tesc în etanol 96°. 5. Se includ într-un mediu hidrosolubil. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în albastru-închis.

3. STEROID 3-BETA-OI-DEHIDROGENAZA (3-ALFA-HIDROXI-STEROID-DEHIDROGENAZA E.C. 1.1.1.50. ȘI 3-BETA-HIDROXISTEROID-DEHIDROGENAZA E.C. 1.1.1.51.)

METODA WATTENBERG (CU NEOTETRAZOLIU). **Principiul metodei.** Enzima eliberează hidrogenul din substratul specific (dehidroepiandrosteron). Hidrogenul este acceptat de o sare de tetrazoliu (neotetrazoliu), care se reduce în formazan insolubil și colorat. **Reactivi:** 1. Lichid Krebs modificat (1000 ml NaCl 0,21 M, 40 ml KCl 0,21 M; 10 ml $Na_2SO_4 \times$ $\times 7\ H_2O$ 0,21 M și 360 ml tampon fosfat 0,21 M cu pH 8,0). 2. Mediu de incubare preparat din 0,5 ml soluție dehidroepiandrosteron 0,01 M în acetonă; 7,5 ml soluție NAD 0,0013 M în lichid Krebs modificat; 1 ml soluție nicotinamidă 0,04 M în apă distilată și 1 ml soluție de clorură de neotetrazoliu 0,6% în apă distilată. **Tehnica:** 1. Se folosește material proaspăt secționat la criotom. Secțiunile se aplică pe lame. 2. Se spală inițial 10 minute la 4°C, apoi 5 minute la 25°C în lichidul Krebs modificat (o parte) diluat cu apă distilată (2 părți). 3. Se incubează timp de 20 minute, la 38°C, în mediul de incubare. 4. Se spală 5 minute în lichidul Krebs modificat. 5. Se fixează 10 minute în formol neutru 10%. 6. Se montează într-un mediu hidrosolubil. **Preparatul de control:** incubare într-un mediu fără substrat sau într-un mediu în care substratul este înlocuit cu testosteron, cortizon sau dezoxicorticosteron. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în roșu pînă la albastru.

Scanned with OKEN Scanner

4. SUCCINDEHIDROGENAZA (E.C. 1.3.99.1.)

METODA NACHLAS-TSOU-SOUZA-CHANG-SELIGMAN. **Principiul metodei.** Succindehidrogenaza eliberează hidrogenul din sărurile acidului succinic, transformîndu-le în fumarat. Hidrogenul eliberat este acceptat de o sare de tetrazoliu care se reduce astfel în formazan insolubil și colorat. **Reactivi:** 1. Mediu de incubare format din 5 ml tampon fosfat 0,2 M cu pH 7,5; 5 ml succinat de sodiu 0,2 M; 10 ml soluție apoasă a unor săruri de tetrazoliu (de exemplu nitro BT 1 mg/ml; tetranitro BT 0,5 mg/ml; neotetrazoliu 2 mg/ml). **Tehnica:** 1. Se folosește material proaspăt, secționat la criotom sau la microtomul cu congelație. Secțiunile se aplică pe lame. 2. Se incubează timp de 5—60 minute, la 37°C în mediul de incubare. 3. Se fixează 30 minute în formol neutru 10%. 4. Se spală în apă distilată. 5. Se montează într-un mediu hidrosolubil. **Preparatul de control** se obține prin incubare într-un mediu fără substrat (succinat de sodiu) sau prin adăugarea de inhibitori specifici (3—4 mg malonat la 1 ml mediu de incubare). **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în albastru (nitro BT), roșu-brun (tetranitro BT), roșu pînă la albastru (neotetrazoliu). **Observații:** 1. Enzima este foarte sensibilă față de orice fixator. 2. Enzima este localizată în mitocondrii și puternic legată de acestea, încît difuzarea ei nu se produce decît atunci cînd se efectuează manopere care determină fenomene de citoliză. 3. Unii autori recomandă ca după incubare să se facă o spălare timp de 1 minut într-o soluție de clorură de sodiu 0,9% și în continuare o deshidratare în concentrații crescînde de alcool (începînd cu alcool de 30°, fiecare baie avînd o durată de 5 mi-

Scanned with OKEN Scanner

nute. Urmează clarificarea în xilol timp de 10—20 minute și montarea în balsam de Canada.

Metoda Farber-Louvière. **Principiul metodei:** este similar cu cel din metoda precedentă, cu deosebirea că se adaugă în plus albastru de metilen, care transportă hidrogenul eliberat și mărește sensibilitatea metodei, deoarece albastrul de tetrazoliu este un slab acceptor de hidrogen. **Reactivi:** 1. Mediu de incubare format din 0,3 ml succinat de sodiu 0,5 M; 1 ml tampon fosfat 0,1 M cu pH 7,4; 0,3 ml soluție clorură de calciu 0,004 M; 0,15 ml soluție bicarbonat de sodiu 0,6 M; 0,7 ml soluție 0,1% albastru de tetrazoliu; 0,05 ml soluție 0,1% albastru de metilen și 0,5 ml apă distilată. 2. Azot imbuteliat. **Tehnica:** 1. Se folosește material proaspăt secționat la criotom sau la microtomul cu congelare. Secțiunile sînt recoltate în tampon rece 0,1 M cu pH 7,4. 2. Se incubează timp de 10 minute la 37°C, în mediul de incubare. În acest timp se îndepărtează aerul din recipient printr-un curent de azot. 3. Se spală rapid cu apă distilată. 4. Se fixează, aproximativ 30 minute, în formol neutru 10%. 5. Se spală cu apă curentă. 6. Se montează într-un mediu hidrosolubil. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în albastru.

Metoda Goebel-Puchtler. **Principiul metodei:** este identic cu cel din metoda Nachlas și col. **Reactivi:** 1. Mediu de incubare format din 25 ml apă distilată; 25 ml tampon fosfat 0,2 M cu pH 7,6; 25 ml succinat disodic 0,2 M; 25 ml amestec de săruri și 100 mg nitro BT sau o altă sare de tetrazoliu. Amestecul de săruri este compus din 68 ml apă distilată; 2 ml clorură de calciu 0,25 M; 2 ml sulfat de mag-

Scanned with OKEN Scanner

neziu 0,05 M; 20 ml bicarbonat de sodiu 0,6 M şi 8 ml clorură de aluminiu 0,01 M. **Tehnica:** 1. Se foloseşte material proaspăt secţionat la criotom. 2. Secţiunile se incubează pînă la 20 minute, la 37°C, în mediul de incubare. 3. Se introduc în tampon fosfat 0,2 M cu pH 7,6 timp de 2 minute. 4. Se fixează timp de 10 minute în formol neutru 10%. 5. Se spală în 3 băi de apă distilată a cîte 5 minute. 6. Se montează într-un mediu hidrosolubil. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în violet închis.

5. MONOAMINOOXIDAZA (E.C. 1.4.3.4.)

METODA KOELLE-VALK. **Principiul metodei.** Enzima catalizează dezaminarea oxidativă a triptaminei, rezultînd aldehide care sînt puse în evidenţă cu ajutorul hidrazidei 2-hidroxi-3-naftoice, produsul fiind postcuplat cu o sare de diazoniu. **Reactivi:** 1. Mediu de incubare compus din 1,5 ml apă distilată; 0,1 ml soluţie apoasă 0,1 M de clorhidrat de triptamină; 3 ml soluţie apoasă 0,005 M de hidrazidă 2-hidroxi-3-naftoic; 0,15 ml hidroxid de sodiu 1 N; 15 ml soluţie 0,2 M de fosfat disodic şi 7,5 ml soluţie 40% de sulfat de sodiu. 2. Soluţie de Fast Blue B aproximativ 0,1% în tampon fosfat cu pH 7,4. **Tehnica:** 1. Se foloseşte material proaspăt secţionat la criotom sau la microtomul cu congelare. Secţiunile se aplică pe lamă. 2. Se incubează timp de 2 ore, la 37°C în mediul de incubare. 3. Se spală cu apă distilată. 4. Se introduc timp de 5 minute în soluţia conţinînd sarea de diazoniu. 5. Se spală cu apă distilată. 6. Se fixează în formol neutru 10% timp

Scanned with OKEN Scanner

de 10 minute. 7. Se spală în apă curentă. 8. Se montează într-un mediu hidrosolubil. **Preparatul de control** se obţine cu ajutorul inhibitorului specific 2-izopropilhidroazidă izonicotinică („Marsilid"). Secţiunile se preincubează în Marsilid 0,01 M, după care se incubează în mediul propriu-zis (cantitatea din formulă), la care s-au adăugat 0,15 ml Marsilid 0,1 M. **Preparatul martor** se poate obţine din ţesuturi bogate în monoaminooxidază ca de exemplu ficat, rinichi, intestin, ţesut nervos. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în albastru sau purpuriu.

Metoda Glenner-Butner-Brown. **Principiul metodei.** Enzima catalizează dezaminarea oxidativă a triptaminei, proces care împreună cu reducerea nitro BT-ului formează un sistem redox. **Reactivi:** 1. Mediu de incubare format din 25 mg clorhidrat de triptamină; 4 mg sulfat de sodiu (facultativ); 4 mg nitro BT; 5 ml tampon fosfat 0,1 M cu pH 7,6 şi 15 ml apă distilată. **Tehnica:** 1. Se foloseşte ţesut proaspăt secţionat la rece şi aplicat pe lame. 2. Secţiunile se incubează timp de 30—45 minute, la 37°C, în mediul de incubare. 3. Se spală în apă curentă timp de 10 minute. 4. Se fixează 10 minute, la 37°C, în formol neutru 10%. 5. Se montează într-un mediu hidrosolubil. **Preparatul de control şi cel martor** se obţin ca în metoda precedentă. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în albastru, roşu sau purpuriu. **Observaţii:** 1. Se poate face o deshidratare în acetonă şi clarificarea într-o hidrocarbură benzenică, în vederea montării într-un mediu sintetic. În acest caz preparatele vor avea numai o culoare albastră, deoarece componenta roşie şi purpurie dispar.

Scanned with OKEN Scanner

6. CITOCROMOXIDAZA (E.C. 1.9.3.1.)

G-NADIREACȚIA DUPĂ GRÄFF, VARIANTA MOOG. **Principiul metodei.** În urma activității citocromoxidazei, amestecul de alfa naftol și dimetilparafenilendiamină devine donator de hidrogen, rezultînd prin cuplare oxidativă albastru de indofenol, un produs de condensare de culoare albastră (cuvîntul „nadi" provine din inițialele reactivilor principali). **Reactivi:** 1. Mediu de incubare compus din 25 ml tampon fosfat cu pH 7,2—7,6; 1—2 ml soluție 1% de alfa naftol în etanol de 40° și 1—2 ml soluție apoasă proaspătă 1% de clorhidrat de dimetilparafenilendiamină. 2. Soluție 0,85% de clorură de sodiu. 3. Soluție de azidă de sodiu (NaN_3) 0,005 M în ser fiziologic. 4. Soluție de feniluretan 0,003 M în ser fiziologic. **Tehnica:** 1. Se folosesc secțiuni destul de groase, obținute din material proaspăt, prin secționare la criotom sau la microtomul cu congelare. Se evită orice fixare, care inactivează enzima. 2. Secțiunile se incubează timp de 3—5 minute la 37°C sau timp de 10 minute pînă la o oră la temperatura laboratorului. În momentul cînd culoarea albastră a secțiunilor este suficient de intensă, reacția va fi întreruptă. 3. Secțiunile se spală în clorură de sodiu 0,85%. 4. Se montează într-un mediu hidrosolubil și se lutează marginile lamelei. Oricum, culoarea albastră devine repede palidă.

Preparatul de control. Trebuie efectuate 3 preparate de control și anume:

— Un preparat în care citocromoxidaza este inhibată în mod specific, prin tratare prealabilă timp de 3 minute într-o soluție 0,005 M de azidă de sodiu în ser fiziologic, soluția fiind acidifiată la un pH de 6,0. Incubarea acestor secțiuni se face într-un

Scanned with OKEN Scanner

mediu la care s-a adăugat azidă de sodiu într-o concentrație finală de 0,005 M.

— Un preparat în care să se verifice dacă o eventuală reacție negativă se datorește prezenței unor dehidrogenaze care ar putea să reducă albastrul de indofenol. În acest scop se produce o inactivare a acestor dehidrogenaze, prin tratarea prealabilă a secțiunilor de control timp de 3 minute cu o soluție de feniluretan 0,003 M.

— Un preparat în care să se verifice dacă o eventuală reacție negativă se datorește unei penetrații slabe a reactivului în țesut. În acest scop, după o scurtă incubare a unei secțiuni de control, acesta se introduce într-o soluție 1% de fericianură de potasiu, care oxidează reactivul în albastru de indofenol.

Rezultat: Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în albastru violet. **Observații:** 1. Dezavantajele metodei sînt hidrosolubilitatea produsului de reacție, instabilitatea sa și tendința de a cristaliza. 2. M o o g recomandă pentru montare o soluție 20% de acetat de potasiu, fiind necesară lutarea lamelei. 3. Se poate efectua o supracolorare a nucleilor înainte de montare.

METODA NACHLAS-CRAWFORD-GOLDSTEIN-SELIGMAN (NADIREACȚIE MODIFICATĂ). **Principiul metodei** este similar cu cel din metoda precedentă, cu deosebirea că în loc de dimetilparafenilendiamină se folosește 4-amino-N,N′-dimetilnaftilamină (ADN). Mediul de incubare mai conține în plus citrocrom C (substratul natural al citocromoxidazei din organism) și catalază, care inhibă peroxidazele (acestea dau așa-numita M-nadireacție, dacă se acționează cu un mediu de incubare alcalinizat și pe secțiuni fixate cu formol). **Reactivi:** 1. Mediu de incubare preparat proas-

Scanned with OKEN Scanner

păt din 3 ml tampon fosfat 0,1 M cu pH 7,4; 4 ml soluţie apoasă de alfanaftil 0,01%; 1 ml catalază (preparat comercial); 3 ml soluţie apoasă de citocrom C 0,5% şi 4 ml de clorhidrat sau oxalat de 4-amino-N,N′-dimetilnaftilamină soluţie apoasă 0,2%. **Tehnică:** 1. Se foloseşte material proaspăt secţionat la rece. Secţiunile pot fi lipite pe lame. 2. Se incubează timp de 10—30 minute, la temperatura laboratorului. 3. Se spală rapid în ser fiziologic. 4. Se montează într-un mediu hidrosolubil. **Preparatele de control** se obţin ca în metoda precedentă. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în violet-purpuriu şi au un aspect granular. **Observaţii:** 1. Produsul de reacţie este mult mai stabil decît în metoda precedentă. 2. Adaosul de citocrom C şi catalază nu este necesar atunci cînd ţesutul este bogat în acestea. De asemenea, lipsa de citocrom C (foarte scump) poate fi compensată prin prelungirea incubării cu 5—10 minute. Adaosul de catalază poate fi omis atunci cînd nu există iminenţa unei M-nadireacţii.

Metoda burstone. **Principiul metodei.** Pentru cuplare oxidativă se foloseşte un amestec donator de hidrogen format din N-fenil-p-fenildiamină şi un derivat naftolic (pirazolonic sau o arilamină). Produsul de condensare care rezultă este chelat cu o sare de cobalt. **Reactivi:** 1. Mediu de incubare format din 10 mg N-fenil-p-fenilendiamină bază, nu clorhidrat; 10 mg 1-hidroxi-2-naftilanilidă (sau un alt derivat destinat cuplării, vezi la „Observaţii"); 0,5 ml aclool etilic absolut; 35 ml apă distilată şi 15 ml tampon tris-HCl cu pH 7,4. Se agită şi se filtrează. 2. Amestec chelator format din 100 ml formol 10% neneutralizat; 10 g acetat de cobalt şi 5 ml tampon acetat 0,2 ml cu pH 5,2. **Tehnica:** 1. Se

Scanned with OKEN Scanner

folosește material proaspăt secționat la rece. 2. Secțiunile se incubează timp de 10 minute pînă la o oră, la temperatura camerei. 3. Se trec imediat în amestecul chelator, unde se țin timp de aproximativ o oră sau mai mult. 4. Se spală timp de 10 minute în apă curentă. 5. Se montează într-un mediu hidrosolubil. **Preparatul de control** se obține prin inhibarea prealabilă a enzimei cu cianură de potasiu 0,001 M sau prin incubare într-un mediu fără N-fenil-p-fenilendiamină. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în roșu.

Observații: 1. În locul derivatului naftolic 1-hidroxi-2-naftilanilidă se pot întrebuința alți derivați naftolici (de exemplu, 1-hidroxi-2-acetonaftonă, 1-hidroxi-2-acid naftolic, naftol AS-L3G, naftol AS-LG etc.), derivați pirazolonici (1-fenil-3-metil-pirazolon etc.) sau arilamine (p-metoxi-p-aminofenilamin; 3-amino-9-etilcarbazol; 8-amino-1,2,3,4-tetrahidrocolin etc.). În cazul ultimei substanțe menționate se adaugă o picătură, produsul de reacție fiind albastru. 2. Metoda este considerată cea mai bună și cea mai simplă dintre metodele folosite pentru decelarea activității citocromoxidazei. Produsele de reacție sînt mai puțin solubile și mai stabile decît la celelalte metode.

7. TIROZINAZA (E.C. 1.10.33.1.)

METODA BLOCH (CU DIOXIFENILALANINĂ), VARIANTA LAIDLAW-BLACKBERG (pentru piese mici). **Principiul metodei:** Tirozinaza (numită și Dopa-oxidaza) catalizează oxidarea tirozinei în dioxifenilalanină (Dopa) și a acesteia într-o serie de produse intermediare, care duc în final la formarea melaninei (de culoare neagră-brună). **Reactivi:** 1. Mediu de incubare com-

Scanned with OKEN Scanner

pus dintr-o soluţie 0,1% de dioxifenilalanină (Dopa) în tampon fosfat 0,1 M cu pH 7,4. **Tehnica.** 1. Piesele se fixează în formol neutru 10%, timp de o oră, la temperatura laboratorului. Se taie felii a căror grosime să nu depăşească 2 mm şi acestea se spală timp de 3 minute în apă curentă. 2. Feliile se incubează timp de o oră, la 37°C în mediul de incubare. După acest interval se aruncă soluţia, se înlocuieşte cu alta nouă şi se continuă incubarea la 37°C încă 12—15 ore, sub observaţie. 3. Se spală cu apă curentă aproximativ 10 minute. 4. Se refixează în amestec Bouin timp de 24 ore. 5. Feliile se deshidratează şi se includ în parafină. 6. Se secţionează. 7. Se efectuează o coloraţie de fond (facultativ). 8. Se montează într-un mediu anhidru. **Preparatul de control** se obţine prin incubare fără substrat. Este necesară efectuarea acestui preparat, deoarece în ţesut pot să existe de la bun început depuneri de melanină. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar sub formă de granule de culoare brună pînă la negru, **Observaţii:** 1. Melanina este stabilă şi insolubilă în apă şi alcool, încît preparatele pot fi montate în balsam de Canada. 2. Tirozinaza este o monofenolază (monofenoloxidază), deoarece pe lîngă tirozină şi Dopa ea oxidează şi alţi fenoli.

METODA BLOCH (CU DIOXIFENILALANINĂ) VARIANTA GOMORI (pentru secţiuni). **Principiul metodei.** Este identic cu cel din metoda precedentă. **Reactivi:** 1. Mediu de incubare identic cu cel din metoda precedentă. **Tehnica:** 1. Piesele se fixează timp de cîteva ore (nu mai mult de 7 ore) în formol neutru 10% rece şi se secţionează la microtomul cu congelare. Se poate folosi de asemenea material criodesicat, inclus în parafină. 2. Secţiunile obţinute la microtomul cu congelare se spală rapid (5 secunde) în apă

Scanned with OKEN Scanner

pus dintr-o soluţie 0,1% de dioxifenilalanină (Dopa) în tampon fosfat 0,1 M cu pH 7,4. **Tehnica.** 1. Piesele se fixează în formol neutru 10%, timp de o oră, la temperatura laboratorului. Se taie felii a căror grosime să nu depăşească 2 mm şi acestea se spală timp de 3 minute în apă curentă. 2. Feliile se incubează timp de o oră, la 37°C în mediul de incubare. După acest interval se aruncă soluţia, se înlocuieşte cu alta nouă şi se continuă incubarea la 37°C încă 12—15 ore, sub observaţie. 3. Se spală cu apă curentă aproximativ 10 minute. 4. Se refixează în amestec Bouin timp de 24 ore. 5. Feliile se deshidratează şi se includ în parafină. 6. Se secţionează. 7. Se efectuează o coloraţie de fond (facultativ). 8. Se montează într-un mediu anhidru. **Preparatul de control** se obţine prin incubare fără substrat. Este necesară efectuarea acestui preparat, deoarece în ţesut pot să existe de la bun început depuneri de melanină. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar sub formă de granule de culoare brună pînă la negru, **Observaţii:** 1. Melanina este stabilă şi insolubilă în apă şi alcool, încît preparatele pot fi montate în balsam de Canada. 2. Tirozinaza este o monofenolază (monofenoloxidază), deoarece pe lîngă tirozină şi Dopa ea oxidează şi alţi fenoli.

METODA BLOCH (CU DIOXIFENILALANINĂ) VARIANTA GOMORI (pentru secţiuni). **Principiul metodei.** Este identic cu cel din metoda precedentă. **Reactivi:** 1. Mediu de incubare identic cu cel din metoda precedentă. **Tehnica:** 1. Piesele se fixează timp de cîteva ore (nu mai mult de 7 ore) în formol neutru 10% rece şi se secţionează la microtomul cu congelare. Se poate folosi de asemenea material criodesicat, inclus în parafină. 2. Secţiunile obţinute la microtomul cu congelare se spală rapid (5 secunde) în apă

Scanned with OKEN Scanner

distilată. O spălare prelungită extrage enzima. 3. Se incubează timp de una sau mai multe ore (nu peste 5 ore) la 37°C. Dacă timpul de incubare depăşeşte o oră, se schimbă soluţia de 1—2 ori. 4. Se spală rapid cu apă curentă. 5. Se efectuează o colorație de fond (facultativ), de exemplu cu violet de crezil. 6. Se montează într-un mediu anhidru. **Rezultatul** este identic cu cel din metoda precedentă.

8. PEROXIDAZA (E.C. 1.11.1.7.)

Metoda Gomori (cu benzidină). **Principiul metodei:** Peroxidaza dislocă oxigenul din peroxid (apa oxigenată) ceea ce are un efect oxidant (de mobilizare a hidrogenului) asupra benzidinei. Benzidina, prin pierderea de hidrogen, se transformă în „albastru de benzidină" iar acesta în mod spontan se transformă în „maro de benzidină". **Reactivi:** 1. Mediul de incubare este un amestec în părţi egale de soluţie-mamă cu benzidină şi apă oxigenată diluată. Soluţia-mamă de benzidină se prepară din 0,2—0,3 g benzidină, care se dizolvă în 100 ml alcool de 95° şi se adaugă 0,5 g nitroprusiat de sodiu dizolvat la rîndul lui în cîţiva ml de apă distilată. Apa oxigenată diluată este o apă de 10 volume (3%) care va fi diluată în proporţie de 1 : 50. **Tehnica:** 1. Metoda se poate aplica la secţiuni obţinute la criotom sau microtomul cu congelare, din ţesuturi proaspete sau fixate cu acetonă, alcool etilic sau alcool-formol. Tehnica se mai poate aplica la piese proaspete de dimensiuni mici, cît şi pe frotiuri. 2. Secţiunile sau frotiurile se incubează timp de aproximativ 5 minute, la temperatura camerei. Pentru piese mici, timpul de incubare este mai lung. 3. Se spală rapid în apă curentă. 4. Se montează într-un mediu anhi-

Scanned with OKEN Scanner

dru sau sintetic. **Preparatul de control** se obține prin inhibarea prealabilă a enzimei într-o soluție de cianură de potasiu 0,01 M. **Preparatul martor** se obține din țesuturi bogate în peroxidază ca de exemplu glanda tiroidă, glanda mamară, acinii glandelor salivare, rinichi (canale colectoare) etc. De asemenea, unele celule ca de exemplu leucocitele și mastocitele sînt bogate în peroxidaze. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în albastru, care tinde să vireze spre brun. **Observații:** 1. Se poate face o supracolorare a nucleilor înaintea montării, folosindu-se un colorant roșu. 2. Preparatele nu sînt stabile.

Metoda van Dujin (cu benzidină). **Principiul metodei** este identic cu cel din metoda precedentă. Pentru a întîrzia pe cît posibil transformarea albastrului de benzidină în maro de benzidină se adaugă acid etilendiamintetraacetic și/sau clorură de amoniu care mențin mai mult timp colorantul albastru. **Reactivi:** 1. Mediul de incubare este un amestec compus din următoarele soluții: 1 ml soluție apoasă saturată de clorură de amoniu (40 g NH_4Cl în 100 ml apă distilată), 1 ml soluție 5% de acid etilendiamintetraacetic (care se ajustează cu NaOH la pH 6,0), 9 ml soluție apoasă saturată de benzidină (50 mg benzidină se dizolvă în 200 ml apă distilată la 80°C, se răcește la temperatura camerei și se filtrează) și o picătură de apă oxigenată 3%. **Tehnica:** 1. Se folosește material proaspăt secționat la rece. 2. Secțiunile se incubează timp de 5—10 minute, la temperatura camerei, în mediul de incubare. 3. Se spală în apă distilată. 4. Se includ într-un mediu hidrosolubil. **Preparatul de control și cel martor** se obțin în mod similar cu metoda precedentă. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate

Scanned with OKEN Scanner

în nuanțe de la verde la albastru. Leucocitele sînt cafenii.

Metoda Wachstein-Meisel (cu benzidină). Această metodă diferă de cea precedentă doar prin compoziția mediului de incubare: se dizolvă 600 mg fericianură de potasiu și 600 mg benzidină în 100 ml alcool etilic de 25°. Amestecul se răcește la +4°C și se filtrează. Înainte de întrebuințare se adaugă 6 picături de perhidrol (H_2O_2 30%). Durata de incubare este de 5—30 minute și se face la +4°C.

Metoda Sato cu benzidină (pentru frotiuri de sînge sau măduvă osoasă). **Reactivi:** 1. Soluție 0,3% de sulfat de cupru în acid acetic 0,1%. 2. Soluție saturată de benzidină cu adaos 0,2% de apă oxigenată. 3. Soluție 1% de safranină. **Tehnica:** 1. Frotiurile se usucă repede la aer. 2. Se introduc timp de 1 minut în soluția de sulfat de cupru. 3. Se spală cu apă distilată. 4. Se introduc timp de 2—8 minute în soluția de benzidină-apă oxigenată. 5. Se spală în apă distilată. 6. Se introduc 20 secunde în soluția de safranină. 7. Se spală în apă distilată și se lasă să se usuce. Culoarea albastră indică prezența activității enzimatice.

Metoda Ritter-Oleson cu alfanaftol (pentru piese mici). **Principiul metodei.** Sistemul oxidant peroxid-peroxidază reacționează cu alfanaftol cîștigînd o puternică afinitate față de colorantul bazic (pironină). **Reactivi:** 1. Amestec fixator compus din 90 ml alcool de 95°, 10 ml formol comercial și 1 ml sodă caustică 0,1 N. 2. Mediu de incubare preparat proaspăt din 100 ml alcool de 40°, 1 g alfanaftol și 0,2 ml perhidrol (apă oxigenată 30%). 3. Soluție colorantă compusă din 96 ml alcool 40°, 0,1 g pironină și 4 ml anilină. **Tehnica:** 1. Piesele tăiate sub-

Scanned with OKEN Scanner

ţire (grosime nu peste 4 mm) se fixează timp de 24 ore în amestec fixator. 2. Se spală 30 minute în apă curentă. 3. Se lasă în apă de robinet (neîmprospătată (timp de 2 ore. 4. Se introduc timp de 24 ore în soluţia de alfanaftol-apă oxigenată. 5. Se spală 10 minute în apă curentă. 6. Se introduc 3—24 ore în soluţia colorantă. 7. Se spală o oră în alcool de 80°. 8. Se deshidratează piesele în alcool absolut, se clarifică într-o hidrocarbură benzenică şi se includ în parafină. Se secţionează, secţiunile se deparafinează şi se montează în balsam de Canada sau într-un mediu sintetic. **Preparatul de control şi cel martor** se obţin ca în metoda Gomori. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar sub formă de granulaţii roşii (un roşu intens).

M-NADIREACŢIA ALCALINĂ DUPĂ GRÄFF. **Principiul metodei.** În urma activităţii peroxidazei, amestecul de alfanaftol şi dimetilparafenilendiamină devine donator de hidrogen, rezultînd prin cuplare oxidativă albastru de indofenol. **Reactivi:** 1. Mediu de incubare format din 2 soluţii care se amestecă în părţi egale. Soluţia (A) se prepară astfel: se fierbe 1 g de alfanaftol în 100 ml apă distilată. Pentru a grăbi dizolvarea se adaugă picătură cu picătură hidroxid de potasiu 25%. Soluţia se lasă să se răcească şi se păstrează la întuneric aproximativ o lună. Soluţia (B) se prepară dizolvînd 1 g dimetilparafenilendiamină (sau clorhidratul care este mai stabil) în 100 ml apă distilată fierbinte. Se poate păstra la întuneric timp de 2—3 săptămîni. 2. Soluţie Lugol diluată 1 : 2. 3. Apă alcalinizată cu carbonat de litiu. **Tehnica:** 1. Se foloseşte material fixat în formol neutru 4—10% şi secţionat la rece sau frotiuri fixate timp de cel mult 2 ore în alcool-

Scanned with OKEN Scanner

formol. 2. Secțiunile sau frotiurile se tratează timp de 1—2 minute la temperatura laboratorului, cu mediul de incubare (amestec A : B = 1 : 1). Se stabilizează colorația prin tratare timp de 2—3 minute cu soluție Lugol. Granulațiile albastre devin negre. 4. Preparatele se spală cu apă alcalinizată pînă la reapariția culorii albastre. 5. Se poate efectua supracolorarea nucleilor cu un colorant roșu. 6. Se montează într-un mediu hidrosolubil. **Preparatul de control și cel martor** se obțin ca în metoda Gomori. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar sub formă de granulații albastre.

Metoda Lison cu leucoderivat de zinc. **Principiul metodei.** Sistemul peroxid-peroxidază are un efect oxidant (de mobilizare a hidrogenului) asupra leucoderivatului de zinc, care se transformă într-un colorant chinonic albastru. **Reactivi:** 1. Mediul de incubare se prepară astfel: se fierbe un amestec format din 1,5 g fuxină acidă, 10 g zinc pulbere, 2 ml acid acetic glacial și 100 ml apă distilată. După cîteva minute soluția devine galbenă. După răcire se mai adaugă 2 ml acid acetic glacial. Soluția se poate conserva mai multe zile fără să se coloreze. Înainte de întrebuințare se filtrează și la 10 ml filtrat se adaugă 1 ml apă oxigenată de 10 volume (3%). **Tehnica:** 1. Se folosește material fixat 24 ore în formol neutru 10% și secționat la rece. 2. Secțiunile se introduc 5—10 minute, la temperatura camerei, în mediul de incubare. 3. Se spală în apă distilată. 4. Se montează într-un mediu anhidru. **Preparatul de control și cel martor** se obțin ca în metoda Gomori. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar sub formă de granulații albastre. **Ob-**

Scanned with OKEN Scanner

servații: 1. Înaintea montării se poate efectua o colorație nucleară sau o colorație de fond. 2. Preparatele sînt foarte stabile, localizarea enzimatică foarte bună, încît se consideră că metoda cu leucoderivat de zinc este una din cele mai bune metode pentru decelarea peroxidazei. 3. În cazul frotiurilor de sînge, reactivul va fi diluat de 5—10 ori. 4. **Varianta Fautrez-Dunn** folosește în loc de fuxină acidă, albastru-patent. Durata incubării este de 3—5 minute.

9. DIAFORAZA NAD ȘI DIAFORAZA NADP

METODA NOVIKOFF (cu nitro BT). **Principiul metodei.** Diaforazele reprezintă un sistem enzimatic care transmite hidrogenul de la NAD·H respectiv NADP·H la o sare de tetrazoliu (nitro BT); acesta se reduce în formazan insolubil și colorat. **Reactivi:** 1. Mediu de incubare compus din 4 mg NAD·H sau NADP·H; 0,8 ml tampon fosfat 0,1 M cu pH 7,4; 1 ml soluție apoasă 0,1% de nitro BT și 1,2 ml apă distilată. **Tehnica:** 1. Se folosește material proaspăt sau material fixat în formol-calciu, secționat la rece. 2. Secțiunile se incubează timp de 15—30 minute, la 37°C. 3. Se spală în apă distilată. 4. Se montează într-un mediu hidrosolubil. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în albastru-închis. **Observații:** 1. Diaforaza NAD reprezintă doar o parte din sistemul enzimatic al NAD·H-citocrom-c-reductazei și autorul metodei propune ca enzima să fie denumită în mod corect NAD·H-nitro BT-reductază (în mod similar diaforaza NADP să fie denumită NADP·H-nitro BT-reductază). 2. În loc de nitro BT se poate intrebuința

Scanned with OKEN Scanner

tetranitro BT. 3. Punînd în evidenţă activitatea enzimatică a diaforazelor, se identifică indirect mitocondriile.

Metoda Scarpelli-Hess-Pearse (cu MTT). **Principiul metodei.** Diaforazele transmit hidrogenul de la NAD·H respectiv NADP·H la o sare de tetrazoliu (MTT); formazanul rezultat este cuplat cu o sare de cobalt. **Reactivi:** 1. Mediul de incubare se prepară în felul următor: se amestecă 2,5 ml tampon fosfat 0,06 M (pH 8,2) cu 0,3 ml soluţie de clorură de cobalt 0,5 M, se agită, se filtrează, se adaugă 2,5 ml soluţie 0,1% de MTT şi 4,1 ml apă distilată (în care s-au dizolvat 75 mg de polivinilpirolidon). Se ajustează pH-ul la 7,2 cu tampon tris 0,2 M (pH 10,4), controlînd pH-ul soluţie cu un pH-metru. Amestecul se păstrează la frigider timp de aproximativ o lună. Înainte de întrebuinţare se dizolvă în amestec NAD·H sau NADP·H 1 mg/ml. Se agită pînă la dizolvare şi se ajustează pH-ul la 7,2 cu 1—2 picături de tampon tris 0,2 M cu pH 10,4. 2. Mediu de montare hidrosolubil cu adaos de clorură de cobalt 0,5 M. **Tehnica:** 1. Se foloseşte material proaspăt sau material fixat în formol-calciu (15 minute la 3°C). Se mai poate întrebuinţa material fixat 15 minute la 3°C în acetonă rece, ceea ce prezintă avantajul că se extrag lipidele, evitîndu-se unele artefacte. Indiferent de prelucrarea materialului, secţionarea se face la rece şi fixatorul se elimină din secţiuni prin spălare cu apă distilată (formol) sau prin uscare la aer (acetonă). Secţiunile se aplică pe lame. 2. Se acoperă cu 0,1—0,2 ml mediu de incubare şi se incubează neacoperite timp de 5—30 minute, la 37°C, în mediul de incubare. 3. Se

Scanned with OKEN Scanner

spală cu acid clorhidric 1%. 4. Se spală cu apă distilată. 5. Se refixează în formol-calciu timp de 5—30 minute. 6. Se spală în apă distilată. 7. Montare. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în negru.

METODA NACHLAS-WALKER-SELIGMAN PENTRU DIAFORAZA NAD

Principiul metodei. Dehidrogenaza lactică eliberează hidrogenul din substratul specific (lactat de sodiu), transferîndu-l NAD-ului. Diaforaza NAD transmite hidrogenul de la NAD.H la o sare de tetrazoliu (nitro BT); aceasta se reduce în formazan insolubil și colorat. **Reactivi:** 1. Mediul de incubare este un amestec de 0,6 ml soluție lactat de sodiu 0,5 M: 0,2 ml soluție de hidrogenază lactică 1,5%: 0,3 ml soluție NAD 0,5%; 0.3 ml solutie nitro BT 0,5%: 1 ml tampon fosfat 0,2 M cu pH 7,4 și 0,6 ml apă distilată. Soluția de lactat de sodiu și cea de dehidrogenază lactică se prepară cu apă distilată, fără ajustarea pH-ului și se păstrează la congelator (—20°C). Celelalte solutii se ajustează la pH 7,4 și se păstrează la frigider. **Tehnica:** 1. Se folosește material proaspăt secționat la criostat. Sectiunile se aplică pe lame. 2. Se acoperă cu 0,1—0,2 ml substrat și se incubează neacoperite timp de 5—30 minute, la temperatura camerei. 3. Se spală cu apă distilată. 4. Se fixează în formol salin 5—10 minute. 5. Se spală cu alcool de 15° timp de 5—30 minute. 6. Se clătesc cu apă distilată. 7. Se montează într-un mediu hidrosolubil. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în albastru.

METODA NACHLAS-WALKER-SELIGMAN PENTRU DIAFORAZA NADP.

Principiul metodei este similar cu cel din metoda precedentă. În locul sistemului reducător dehidro-

Scanned with OKEN Scanner

genază lactică-lactat de sodiu se folosește sistemul izocitrat de sodiu-malat de sodiu. **Reactivi:** 1. Mediul de incubare este un amestec compus din 0,6 ml DL-izocitrat de sodiu 1,1 M; 0,5 ml L-malat de sodiu 2,5 M; 0,3 ml clorură de mangan 0,005 M; 0,2 ml NADP soluție 0,5%; 0,3 ml nitro BT soluție 0,5% și 1,1 ml tampon acetat-veronal 0,05 M cu pH 7,4. Soluția de NADP se prepară fără ajustarea pH-ului și se păstrează la congelator, iar celelalte soluții se aduc la pH 7,4 și se păstrează la frigider. **Tehnica și rezultatele:** similare cu cele din metoda precedentă.

F. METODE PENTRU CLASA HIDROLAZE

1. ESTERAZA NESPECIFICĂ (ALIESTERAZA E.C. 3.1.1.1. ȘI ARILESTERAZA E.C. 3.1.1.2.)

METODA NACHLAS-SELIGMAN (de azocuplare cu alfa-naftil-acetat și o sare de diazoniu). **Principiul metodei.** Esterazele descompun alfanaftilacetatul în alfanaftol și acid acetic. Naftolul va fi cuplat simultan cu o sare de diazoniu rezultînd un colorant azoic insolubil în apă. Prin această metodă se pune în evidență concomitent și lipaza. **Reactivi:** 1. Mediul de incubare se prepară din 20 ml tampon fosfat 0,1 M cu pH 7,4; 0,5 ml soluție 1% de alfanaftilacetat în acetonă; 10—20 mg sare de diazoniu (Fast Blue B, Fast Garnet GBC, Fast Red RC). Amestecul se filtrează. Dacă apare o culoare violetă după adăugarea sării de diazoniu, acest lucru denotă alterarea sub-

Scanned with OKEN Scanner

stratului (cu eliberarea de alfanaftol) și în acest caz se recurge la o altă mostră de sare de diazoniu. **Tehnica:** 1. Se folosește țesut proaspăt sau fixat în formol-calciu rece sau formol neutru 10% rece, secțiunile făcîndu-se la criostat sau microtomul cu congelare. Grosimea secțiunilor este de 10—15 microni. Se poate face o includere în parafină, dar alcoolul trebuie în permanență înlocuit cu acetona. 2. Secțiunile se incubează timp de 1—15 minute la temperatura camerei. Ele se pot examina la microscop încă în cursul reacției. 3. Se spală în apă curentă 3—5 minute. 4. Se montează într-un mediu hidrosolubil; dacă s-a folosit Fast Blue B, se poate practica deshidratarea cu acetonă, clarificarea cu xilol și montarea într-un mediu anhidru. **Preparatul de control** se obține prin incubarea secțiunilor într-un mediu fără substrat. **Preparatul martor** se poate obține din țesuturi bogate în esteraze nespecifice ca de exemplu ficat, pancreas, rinichi, intestin (mucoasă), țesut nervos. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în roșu violet sau albastru-negru, în funcție de sarea de diazoniu folosită și de pH-ul mediului de incubare. **Observații:** 1. În loc de 20 ml tampon fosfat 0,1 M cu pH-7,4 se pot folosi 20 ml tampon veronal-HCl 0,1 M cu pH 8,2—8,8, crescînd însă în acest caz cantitatea sării de diazoniu de la 10—20 mg la 50 mg. 2. În locul sării de diazoniu se poate întrebuința fuxină hexazotată, mediul de incubare fiind compus din 20 ml soluție NaH_2PO_4 0,15 M; 0,5 ml alfanaftilacetat soluție 1% în acetonă; 1,6 ml fuxină hexazotată (vezi metoda respectivă de la fosfataza acidă nespecifică) și în completare Na_2HPO_4 0,15 M pen-

Scanned with OKEN Scanner

tru ajustarea pH-ului la 7,2—7,5. Secţiunile tratate cu acest amestec pot fi montate într-un mediu anhidru. 3. Înaintea montării se poate efectua o supracolorare a nucleilor, precum şi o colorare de fond. 4. Metoda nu pune în evidenţă exclusiv esterazele nespecifice deoarece naftilacetatul poate fi hidrolizat şi de către lipază şi colinesterază. Aceasta din urmă poate fi exclusă prin inhibarea prealabilă cu ezerină.

Metoda Gomori (de azocuplare cu naftol-as-acetat şi o sare de diazoniu). Metoda se deosebeşte de cea precedentă doar prin compoziţia soluţiei substrat. **Soluţia substrat** se prepară prin dizolvarea a 0,5 g naftol-AS-acetat în 5 ml într-un amestec de 50% acetonă, 15% propilen-glicol şi 35% apă distilată. După dizolvare se adaugă 15 ml propilen-glicol şi se completează cu apă distilată pînă la 50 ml. Această soluţie (1%) o înlocuieşte pe aceea cu alfa-naftilacetat (1%), în cantitate similară (0,5 ml). **Observaţii:** 1. Artefactele de difuziune sînt mult mai mici decît în metoda precedentă şi de aceea există posibilitatea de a prelungi timpul de incubare. 2. **Varianta Burstone** foloseşte acetat de naftol AS—D, mediul de incubare fiind preparat din 5 mg acetat de naftol AS—D, peste care se adaugă 0,5 ml acetonă sau N,N'-dimetilformamidă şi după dizolvare 25 ml apă distilată, 25 ml tampon tris HCl cu pH 7,1 şi 20—40 mg sare de diazoniu roşie. Se filtrează. 3. O variantă a tehnicii Burstone recomandă pentru secţiunile obţinute prin criodesicare şi incluse în parafină la vid, precum şi pentru secţiunile la parafină obţinute din material fixat în acetonă rece, următorul amestec incubator pe bază de acetat de naftol

Scanned with OKEN Scanner

AS-LC: se dizolvă 20 mg acetat de naftol AS—LC în 2—4 ml N,N'-dimetilformamidă sau dimetilsulfoxid, se adaugă 5—10 ml monoetiletilenglicol, 10 ml tampon tris HCl cu pH 7,1, se completează la 50 ml cu apă distilată, se adaugă 20—30 mg sare de diazoniu roșie și se filtrează.

Metoda Barnett-Seligman-Holt (cu acetați de indoxil). **Principiul metodei.** Esterazele descompun prin hidroliză esterii de indoxil, eliberînd indoxilul, datorită prezenței oxigenului atmosferic molecular. Prin această metodă se pune în evidență concomitent și lipaza. **Reactivi:** 1. Mediu de incubare preparat cu un acetat de indoxil halogenat, astfel: se dizolvă 1,3 mg de 5-brom-indoxil-acetat sau un alt ester de indoxil (vezi „observații") în 0,1 ml alcool etilic și se adaugă 2 ml tampon tris-HCl 0,1 M cu pH 8,5; se adaugă 1 ml dintr-un amestec în părți egale de ferocianură de potasiu 0,05 M și fericianură de potasiu 0,05 M (acest amestec grăbește oxidarea indoxilului); 0,1 ml clorură de calciu 1 M; 5 ml clorură de sodiu 2 M și 1,8 ml apă distilată. **Tehnica:** 1. Se folosește țesut fixat în formol-calciu sau formol neutru 10% timp de 24 de ore și secționat la rece. Piesele nu se spală cu apă înaintea secționării. 2. Secțiunile se incubează fie la 22°C, fie la 37°C, un timp foarte variabil (de la cîteva minute la cîteva ore). Reacția va fi urmărită la microscop și întreruptă în momentul dorit. 3. Se spală cu apă distilată. 4. Se montează într-un mediu hidrosolubil sau anhidru. **Preparatul de control și cel martor** se obțin ca în metoda Nachlas-Seligman. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în albastru. **Observații:** 1. În loc de 1,3 mg 5-brom-indoxil-ace-

Scanned with OKEN Scanner

tat se poate întrebuința 1,5 mg 5-brom-4-clorindoxilacetat (cel mai bun) sau 3,0 mg 5-brom-6-clorindoxilacetat. 2. Prin această metodă se pun în evidență exclusiv esterazele lizozomiale, deoarece cele microzomiale sînt complet inhibate. 3. Înaintea montării se poate efectua o supracolorare a nucleilor.

METODA CREVIER-BÉLANGER (cu acid tiolacetic). Această metodă este descrisă la colinesterază. Ea pune în evidență concomitent esterazele nespecifice, lipaza și colinesteraza. Aceasta din urmă poate fi exclusă prin inhibare specifică cu ezerină.

2. LIPAZA (E.C. 3.1.1.3.)

METODA GOMORI (cu tween). **Principiul metodei.** În prezența calciului, lipaza hidrolizează tween-urile (esteri de sorbitoli ai acizilor grași cu polietilenglicol), rezultînd săpunuri de calciu; acestea sînt transformate în săpunuri de plumb și înnegrite cu sulfură de amoniu. **Reactivi:** 1. Mediul de incubare este format din 1 ml soluție apoasă 5% de tween 40 sau tween 60; 45 ml tampon tris sau tampon veronal-acetat 0,05—0,01 M cu pH 7,0—7,4 și 3 ml soluție 2% de clorură de calciu. 2. Soluție apoasă 2% de azotat de plumb. 3. Soluție 1,5—2,0% de sulfură de amoniu. **Tehnica:** 1. Se folosește de obicei un material fixat în formol-calciu sau formol neutru 10%, secționat la criotom sau microtom cu congelare. Se mai poate folosi un material criodesicat, inclus în parafină sau, mai puțin preferabil, un material fixat în acetonă rece și inclus în parafină. În timpul prelucrării se evită alcoolul. 2. Secțiunile se incubează timp de 8—24 ore, la 37°C. 3. Se spală 5—10 mi-

Scanned with OKEN Scanner

nute în apă distilată care se schimbă de mai multe ori. 4. Se introduc timp de 10 minute în soluția de azotat de plumb. 5. Se spală cu apă distilată de mai multe ori. 6. Se introduc timp de 2 minute în soluția de sulfură de amoniu. 7. Se spală timp de 3—5 minute cu apă curentă. 8. Se montează într-un mediu hidrosolubil. Eventual se poate face o deshidratare rapidă cu acetonă, se clarifică cu dicloretilenă și se montează într-un mediu sintetic. Hidrocarburile benzenice provoacă decolorarea preparatului. **Preparatul de control** se poate obține prin inactivarea enzimei la cald (10 minute în apă la temperatura de 90—100°C), cu soluție Lugol (1 minut la temperatura laboratorului) sau cu fenol 5% (1 minut la temperatura laboratorului). **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în nuanțe de la galben la brun-auriu. **Observații:** 1. Se admite supracolorarea nucleilor înaintea montării. 2. Toate substanțele (incluziunile) preexistente în țesut, care se pot transforma în sulfură de plumb (de exemplu calciul, fierul) vor fi puse în evidență prin această metodă. 3. Pentru „lipaza adevărată", G o m o r i recomandă tween 80. 4. Lipaza mai poate fi pusă în evidență prin metodele cu naftil acetați (vezi esteraze nespecifice, metoda Nachlas-Seligman), cu acetați de indoxil (vezi esteraze nespecifice, metoda Barnett-Seligman-Holt) și cu acid tiolacetic (vezi colinesteraza, metoda Grevier-Bélanger).

METODA MARTIN CU TWEEN pentru lipază-esterază. **Principiul metodei** este identic cu cel din metoda precedentă. Pentru esterază se adaugă ca substrat glicerină. **Reactivi:** 1. Mediu de incubare format din 30 ml tampon acetat-veronal 0,05 M cu pH 7,2—

Scanned with OKEN Scanner

7,6; 2—3 ml soluție 2% de clorură de calciu; 10—20 ml glicerină; 2—4 ml soluție stoc și un cristal mic de timol. Soluția stoc se obține din 1 ml tween 40 dizolvat în 49 ml tampon veronal-acetat (pH 7,4) cu adaos de 0,2% clorură de calciu, la care se adaugă un cristal de timol; amestecul se păstrează timp de 2 zile la 37°C și apoi se filtrează. Restul reactivilor, tehnica etc. sînt similare cu cele din metoda precedentă.

3. COLINESTERAZA (ACETILCOLINESTERAZA E.C. 3.1.1.7. ȘI COLINESTERAZA NESPECIFICĂ E.C. 3.1.1.8.)

METODA KOELLE-FRIEDENWALL cu tiocolină cuprică (varianta Coers). **Principiul metodei.** Ambele colinesteraze, respectiv colinesteraza specifică (acetilcolinesteraza) care se găsește în țesuturi sau celule și colinesteraza nespecifică (pseudocolinesteraza) care se găsește în plasma sanguină, hidrolizează iodura de acetiltiocolină din mediul de incubare în acid acetic și tiocoliniodid. Acesta din urmă formează cu ionii de cupru (adăugați la mediul de incubare sub formă de sulfat de cupru) un precipitat de tiocolină cuprică, ce se transformă în sulfură de cupru neagră cu ajutorul sulfurii de amoniu. Prin metoda cu tiocolină cuprică se pun deci în evidență ambele colinesteraze. **Reactivi:** 1. Mediu de incubare format din 0,2 ml glicocol 3,75%; 0,2 ml soluție sulfat de cupru 0, M (2,5%); 5 ml tampon acetat 0,1 M cu pH 5,5; 3,8 ml apă distilată și 0,8 ml soluție de acetiltiocolină (ATC). Soluția ATC la rîndul ei se prepară într-o eprubetă de centrifugă din 15 mg iodură

Scanned with OKEN Scanner

de acetiltiocolină, 0,78 ml apă bidistilată și 0,26 ml soluție sulfat de cupru 0,1 M; acest amestec se centrifughează și se recoltează supernatantul limpede. 2. Soluție de sulfură de amoniu 5%. **Tehnica:** 1. În toate variantele metodei (Coers, Gerebțov, Arvy, Lewis) se folosesc secțiuni relativ groase (50—100 microni) obținute la criotom, cu fixare ulterioară, pentru scurt timp, în formol neutru rece. Se mai pot folosi piese ținute scurt timp (nu peste 6 ore) în formol neutru 10% rece și secționate la criotom. Nu se recomandă folosirea acetonei care inactivează colinesterazele. 2. Secțiunile se spală 30 minute în apă distilată. 3. Se incubează timp de 10—60 minute, la 37°C. 4. Se spală cu apă distilată. 5. Se introduc timp de 5 minute în soluția de sulfură de amoniu. 6. Se spală cu apă distilată. 7. Se montează într-un mediu anhidru. **Preparatul de control** se obține prin incubare într-un mediu la care s-a adăugat salicilat de ezerină (fizostigmină) 10^{-6} M sau sulfat de ezerină (fizostigmină) 1,9 mg/100 ml. Ezerina inhibă deopotrivă ambele colinesteraze. Există și inhibitori numai pentru colinesteraza nespecifică în care secțiunile control se mențin la 37°C înaintea incubării propriu-zise. Asemenea inhibitori sînt tetraizopropilpirofosforamidă (izo-OMPA) 0,034 mg/100 ml și metasulfatul sau clorhidratul de etopropazină 3,12 mg/100 ml. Acești inhibitori se dizolvă în tampon acetat. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în negru-brun sau negru.

Observații: 1. Se admite o supracolorare a nucleilor înaintea montării. 2. **Varianta Coers** se recomandă în primul rînd pentru evidențierea colinesterazei de la nivelul sinapselor neuromusculare. 3. **Varianta Gerebțov** se recomandă pentru țesuturi cu activitate

Scanned with OKEN Scanner

enzimatică variabilă și diferă de varianta Coers doar prin faptul că în loc de 15 mg iodură de acetiltiocolină se întrebuințează 18,5 g iodură de butiriltiocolină. De asemenea, se poate folosi un tampon cu pH 5,0 pentru țesuturi bogate în activitate enzimatică, un tampon cu pH 6,2 pentru țesuturi cu activitate medie și un tampon cu pH 6,8 pentru țesuturi sărace. Tot în varianta Gerebțov, timpul de incubare se poate prelungi pînă la 2 ore. 4. **Varianta Arvy** diferă de varianta Coers prin folosirea acetatului de cupru în loc de sulfat. 5. **Varianta Lewis** folosește un substrat mai diluat în iodură de acetiltiocolină, cu pH 4,2 și un timp de incubare mai îndelungat. 6. După H o l m s t e d t, precipitatul de tiocolină cuprică poate fi văzut la microscopul optic fără a fi nevoie de sulfură de amoniu. 7. În **varianta Karnovsky-Roots** se folosesc secțiuni subțiri, care se lipesc pe lame cu gelatină. Mediul de incubare conține în plus fericianură de potasiu, care dă cu tiocolina cuprică un precipitat brun-roșcat, încît nu mai este necesară sulfura de amoniu.

METODA JOO, SAVAY ȘI CSILLIK (cu tiocolină-plumb). **Principiul metodei.** Colinesterazele hidrolizează iodura de acetilcolină din mediul de incubare în acid acetic și tiocoliniodid. Acesta din urmă formează cu ionii Pb^{++} (adăugați la mediul de incubare sub formă de azotat de plumb) un precipitat de tiocolină-plumb, care se transformă în sulfură de plumb (neagră) cu ajutorul sulfurii de amoniu. **Reactivi:** 1. Mediu de incubare format din 5 mg iodură de acetiltiocolină; 2,5 ml soluție acetat de sodiu 0,1 N; 0,3 ml acid acetic 0,1 N și 0,5 ml soluție azotat de plumb 0,03 M. 2. Soluție sulfură de amoniu 5%. **Tehnica:** 1. Se folosesc secțiuni la criotom, obținute din țesuturi proaspete sau fixate scurt timp la rece în

Scanned with OKEN Scanner

formol neutru 10% sau formol-calciu. 2. Secțiunile se incubează timp de 5—10 minute la +4°C. 3. Se spală cu apă distilată. 4. Se introduc în soluție de sulfură de amoniu timp de 1—2 minute. 5. Se spală cu apă distilată. 6. Se montează într-un mediu anhidru. **Preparatul de control** se poate obține în mod similar cu metoda Koelle-Friedenwald. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în negru.

METODA ERÄNKÖ, KOELLE ȘI RÄISÄNEN (cu tiocolină-plumb și fericianură de potasiu). **Principiul metodei.** Colinesterazele hidrolizează iodura de acetilcolină din mediul de incubare în acid acetic și tiocoliniodid. Acesta din urmă formează cu ionii Pb^{++} (adăugați la mediul de incubare sub formă de acetat de plumb) un precipitat de tiocolină-plumb, care dă cu fericianură de potasiu un complex de culoare galbenă-brună. **Reactivi:** 1. Soluție calciu-Krebs-Ringer pentru spălarea pieselor fixate: 100 ml soluție clorură de sodiu 0,9%; 4,0 ml clorură de potasiu 1,15%; 1,27 ml clorură de calciu 1,22%; 1,0 ml fosfat monopotasic 2,11%; 1,0 ml clorură de magneziu 3,13%; 40 ml fosfat monosodic 3,55% și 2,0 ml acid clorhidric 1 N. 2. Mediu de incubare format din 4,9 ml apă distilată; 4 ml tampon triacetat 0,17 M; 0,5 ml acetat de plumb 0,1 M; 0,05 ml fericianură de potasiu 0,1 M; 0,6 ml acetiltiocolină soluție 0,05 M și 0,01 ml ferocianură de potasiu 0,05 M. Datorită ferocianurii se formează un precipitat alb-gălbui de ferocianură de plumb, care este îndepărtat prin filtrare (cu hîrtie Whatman 3). Tamponul triacetat cu pH 6,0 se prepară din 2 ml acid acetic 1 M și 8 ml tampon tris 0,2 M.

Soluția de acetiltiocolină se prepară din 23 mg iodură de acetiltiocolină, 1,2 ml apă și 0,4 ml soluție

Scanned with OKEN Scanner

acetat de plumb 0,1 M care precipită iodura. Amestecul se centrifughează uşor şi se foloseşte supernatantul. **Tehnica:** 1. Piesele se fixează într-un amestec format din 5 ml formol 40% şi 50 ml soluţie calciu-Krebs-Ringer timp de 2—4 ore la 0—4°C, spălîndu-se ulterior timp de 1—8 ore în soluţie calciu-Krebs-Ringer. Se taie la criotom secţiuni cu o grosime de 10 microni. 2. Secţiunile se spală în 3 băi de triacetat. 3. Se incubează timp de 1—60 minute la 0°C. 4. Se spală în 3 băi de apă distilată la 0°C. Se montează într-un mediu anhidru. Preparatul de control se poate obţine cu inhibitorii enunţaţi la metoda Koelle-Friedenwald. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în galben pînă la brun.

Metoda crevier-bélanger (cu acid tiolacetic). **Principiul metodei.** Acetilcolinesteraza (colinesteraza adevărată sau specifică) are proprietatea de a cataliza hidroliza acidului tiolacetic în acid acetic şi hidrogen sulfurat. Acesta din urmă poate fi pus în evidenţă cu ajutorul ionilor de Pb^{++} care se adaugă mediului de incubare sub formă de azotat de plumb, rezultînd sulfură de plumb neagră. Prin această metodă se pune în evidenţă concomitent acetilcolinesteraza şi esterazele nespecifice. **Reactivi:** Mediul de incubare se obţine prin amestecarea a două soluţii: A şi B. **Soluţia A:** se amestecă 0,15 ml acid tiolacetic cu 5 ml apă distilată; se ajustează pH-ul la 5,0 cu aproximativ 5 ml hidroxid de sodiu 0,1 N; se completează pînă la 100 ml cu tampon acetat 0,2 M cu pH 5,5. **Soluţia B:** 0,5 g azotat de plumb la 1000 ml apă distilată. Înainte de folosire se adaugă la 1000 ml soluţie B, 1 ml soluţie A (picătură cu picătură), se centrifughează şi se utilizează supernatantul. **Tehnica:** 1. Se folosesc secţiuni de 10—20 microni, la

Scanned with OKEN Scanner

criotom, obținute din țesuturi proaspete sau fixate scurt timp (12 ore) la rece în formol-calciu sau formol neutru 10%. 2. Secțiunile se incubează 5—20 minute la 23—25°C. 3. Se spală cu apă distilată. 4. Se montează într-un mediu hidrosolubil sau anhidru. **Preparatul de control** se obține prin tratare prealabilă cu inhibitori ai colinesterazei: bromură de prostigmină 6—10 M, tetra-etil-fosfat 7—10 M sau alți inhibitori menționați în metoda Koelle-Friedenwald. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în negru. **Observații:** 1. Nucleii se pot supracolora (înaintea montării) cu fuxină bazică 0,02%. 2. Metoda, așa cum a fost descrisă, conține modificările aduse de Wachstein și col. care au arătat că hidroliza acidului tiolacetic poate avea loc și sub influența esterazelor nespecifice și a colinesterazelor.

4. FOSFATAZA ALCALINĂ NESPECIFICĂ (E.C. 3.1.3.1.)

Metoda Gomori-Takamatsu (cu calciu-cobalt). **Principiul metodei.** Enzima descompune prin hidroliză betaglicerofosfatul de sodiu în glicerină și acid fosforic. Acidul fosforic intră în reacție cu clorura de calciu, rezultînd fosfat de calciu insolubil, care apoi este transformat în fosfat de cobalt, cu ajutorul unei soluții de clorură sau azotat de cobalt. În continuare, prin prelucrarea secțiunilor cu sulfură de amoniu, fosfatul de cobalt (substanța cromogenă) este transformat în sulfură de cobalt (substanța cromoforă) de culoare neagră sau negru-brună. **Reactivi:** 1. Mediu de incubare format din soluție de betaglicerofosfat de sodiu 3% 10 ml; soluție medinal 2% 10 ml; apă distilată 5 ml; soluție clorură de calciu 2% 20 ml și soluție sulfat de magneziu 5%

Scanned with OKEN Scanner

1 ml. Soluțiile se amestecă înainte de întrebuințare, în ordinea arătată. Fiecare din ele se poate păstra la frigider luni de zile. 2. Soluție de azotat sau clorură de cobalt 2%. 3. Soluție de sulfură de amoniu 2%. **Tehnica:** 1. Secțiunile se pot obține în mai multe feluri. a) Fixarea pieselor în formol tamponat 10% sau formol-calciu, întotdeauna la rece (0—4°C) și fără să fie depășită durata de 24 ore; secționarea se face la rece, iar secțiunile se recoltează în apă distilată. b) Secționarea la criotom sau microtomul cu congelare a pieselor proaspete. c) Fixarea pieselor în alcool de 80° la 0—4°C, timp de 24 ore, urmată de includerea la parafină după tehnica obișnuită. Se recomandă ca durata menținerii în parafină caldă să nu depășească 2 ore, pentru a evita pierderile excesive de enzimă. De aceea se folosește de preferință etuva cu vid. d) Criodesicare și includere în parafină. e) Procedeul original Gomori constă din fixarea pieselor în acetonă la —20°C, timp de 24 ore, urmează două băi de acetonă la temperatura camerei, fiecare de 2 ore, clarificarea în 2 băi de benzen a 45 minute și includerea în parafină. 2. Secțiunile se incubează timp de 1/2—4 ore, la 37°C, în mediul de incubare. 3. Se spală timp de 2 minute în apă distilată. 4. Se introduc timp de 3—5 minute în soluția de azotat sau clorură de cobalt. 5. Se spală din nou timp de 1 minut în apă distilată. 6. Se introduc timp de 1—2 minute în soluția de sulfură de amoniu. 7. Se spală cu apă distilată, în 2 băi a cîte 2 minute. 8. Se montează într-un mediu anhidru. **Preparatul de control** se obține fie prin incubare într-un mediu fără glicerofosfat, fie mai bine prin incubare într-un mediu la care s-a adăugat un inhibitor (cianură de potasiu M/100 sau clorhidrat de cisteină M/4000). De asemenea, se poate

Scanned with OKEN Scanner

recurge la inhibarea enzimei prin introducerea secţiunilor timp de 3 minute în apă distilată la 90°C; riscul dezlipirii este minim dacă secţiunile au fost colodionate. **Preparatul martor** se poate obţine din ţesuturi bogate în fosfatază alcalină ca de exemplu, ficat, pancreas, suprarenală, intestin (mucoasă), rinichi (tub contort şi capsula Bowman), vezica urinară, endotelii. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în negru sau negru-brun. **Observaţii:** 1. Ionii de Mg^{++} din mediul de incubare au rolul de a activa enzima. 2. Medinalul (veronal sodic) menţine pH-ul mediului de incubare la o valoare apropiată de 9,4. 3. După prelucrare cu sulfură de amoniu, se admite o colorare a citoplasmelor cu soluţii apoase 1% de eozină, safranină sau roşu neutru, timp de un minut. 4. Unul din dezavantajele metodei constă în aceea că prelungirea timpului de incubare duce la artefacte prin difuzarea fosfatului de calciu. 5. Un alt dezavantaj al metodei constă în aceea că pune în evidenţă concomitent şi calciul preexistent în ţesut, precum şi depozitele de fier. Pentru a verifica existenţa unor depozite prealabile de calciu, se pot efectua secţiuni de control care se prelucrează cu cobalt înainte de a le introduce în mediul de incubare. 6. Nu se face o supracolorare a nucleilor, deoarece se obţine deja o colorare nucleară prin însăşi metoda în cauză, ceea ce este considerat un artefact.

Metoda Gomori (de azocuplare, cu alfanaftilfosfat de sodiu şi o sare de diazoniu). **Principiul metodei.** Enzima descompune prin hidroliză naftilfosfatul de sodiu în alfanaftol şi fosfat acid de sodiu. Naftolul intră în reacţie cu sarea de diazoniu, rezultînd prin cuplare simultană un colorant azoic insolubil care poate fi vizualizat. **Reactivi:** 1. Me-

Scanned with OKEN Scanner

diu de incubare format din 100 ml tampon veronal sodic 0,1 M cu pH 9,4, în care se dizolvă 100 mg sare sodică de alfa-naftil-1-fosfat și 100 mg sare de diazoniu (Fast Blue B, Fast Blue BB, Fast Black B, Fast Red TR, Fast Violet B etc.). Se pot adăuga 46 picături soluție 10% de sulfat sau clorură de magneziu. Prepararea mediului de incubare se face înainte de întrebuințare și se filtrează. **Tehnica:** 1. Secțiunile se pot obține în mod similar ca în metoda precedentă. 2. Secțiunile se incubează timp de 1—20 minute, la temperatura camerei (să nu depășească 20°C). Acest tratament se poate face și direct pe lamă. 3. Se spală timp de 3 minute în apă distilată. 4. Se montează în glicerină sau sirop Apathy. **Preparatul de control și cel martor** se obțin ca în metoda precedentă. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în albastru-închis, în negru sau în roșu, în funcție de sarea de diazoniu folosită. **Observații:** 1. Colorația este mult mai contrast decît în metoda cu calciu-cobalt. Incluziunile metalice nu pot simula o activitate enzimatică. 2. Metoda este mai rapidă și dă rezultate mai bune în ceea ce privește localizarea enzimei. 3. Se admite supracolorarea nucleilor înaintea montării. 4. Nu se recomandă sarea beta a naftilfosfatului de sodiu, deoarece colorantul azoic rezultat este parțial solubil și poate difuza. 5. Datorită naftilfosfatului, pH-ul mediului de incubare are tendința de a scădea, ceea ce se poate remedia cu hidroxid de sodiu 0,1 M. 6. Există posibilitatea de a efectua montarea într-un mediu anhidru și anume atunci cînd sarea de diazoniu folosită este Fast Blue B, deoarece numai colorantul azoic obținut cu această sare este insolubil în alcool etilic și în hidrocarburi benzenice.

Scanned with OKEN Scanner

Metoda Burstone (de azocuplare, cu fosfat naftol AS și o sare de diazoniu). Metoda Burstone cu naftol AS (anilidă a acidului 3-hidroxi-2-naftoic) are același principiu și aceeași tehnică ca în metoda precedentă. Singura deosebire este că în loc de alfa-naftilfosfat de sodiu se întrebuințează cantități similare de fosfat de naftol AS. Avantajul metodei constă în solubilitatea foarte redusă a produsului de reacție și deci într-o bună localizare a activității enzimatice. Dezavantajul principal este solubilitatea redusă a fosfatului de naftol AS în apă, astfel încît cele 100 mg indicate prin rețetă se dizolvă în prealabil în 0,3 ml N,N'-dimetilformamidă. Montarea se recomandă în polivinilpirolidon (pag. 73).

5. FOSFATAZA ACIDĂ NESPECIFICĂ (E.C. 3.1.3.3.)

Metoda Gomori (cu plumb). **Principiul metodei.** Enzima descompune prin hidroliză betaglicerofosfatul de sodiu din mediul de incubare în glicerină și acid fosforic. Acidul fosforic intră în reacție cu azotatul sau acetatul de plumb, rezultînd fosfat de plumb insolubil, care apoi este transformat în sulfură de plumb neagră, cu ajutorul unei soluții de sulfură de amoniu. **Reactivi:** 1. Mediu de incubare format din 50 ml soluție tampon acetat 0,05 M cu pH 5,0; 5 ml soluție 3% de betaglicerofosfat de sodiu și 80 mg acetat de plumb (sau 100 mg azotat de plumb). Amestecul se prepară extemporan și se filtrează. 2. Soluție de acid acetic 2%. 3. Soluție de sulfură de amoniu 2%. **Tehnica:** 1. Secțiunile se pot obține în mai multe feluri. a) Fixarea pieselor în formol tamponat 10% sau formol-calciu, întotdeauna la rece (0—4°C) și fără să fie depășită durata de 24 ore; secționarea se face la rece, iar secțiunile se

Scanned with OKEN Scanner

recoltează în apă distilată. b) Secționarea la criotom sau la microtomul cu congelare a țesuturilor proaspete. c) Criodesicare și includere în parafină, folosind etuve cu vid. d) Mai puțin recomandată este fixarea în acetonă rece și includerea în parafină, folosind etuva cu vid. 2. Secțiunile se incubează 1—24 ore (de obicei o oră), la 37°C. 3. Se spală în apă distilată, în două băi de cîte 2 minute. 4. Se introduc timp de un minut în soluția de acid acetic 2%. 5. Se spală din nou cu apă distilată timp de 2 minute. Se introduc timp de 1—2 minute în soluția de sulfură de amoniu. 7. Se spală în apă distilată, în două băi a 2 minute. 8. Se montează într-un mediu hidrosolubil sau anhidru. **Preparatul de control** se obține fie prin incubare într-un mediu fără glicerofosfat, fie prin incubare într-un mediu la care s-a adăugat ca inhibitor florura de sodiu 0,001—0,01 M (0,0042% —0,042%), sulfat de cobalt 0,001 M sau cianură de potasiu 0,01 M. **Preparatul martor** se poate obține din țesuturi bogate în fosfatază acidă ca de exemplu, prostată, tumori, rinichi, mamelă, țesuturi care conțin celule cu activitate fagocitară intensă. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în negru. **Observații:** 1. Fosfataza acidă nespecifică nu poate fi pusă în evidență prin metoda calciu-cobalt (vezi fosfataza alcalină), deoarece fosfatul de calciu este solubil în condiții de pH acid. 2. Fosfataza acidă este mult mai sensibilă decît fosfataza alcalină, de aceea timpii operatori trebuie reduși pe cît posibil. Se presupune că albumina glicerinată Mayer inhibă enzima și de aceea, unii autori recomandă lipirea uscată a secțiunilor. 3. În timpul pregătirii țesutului în vederea incubării, se evită complet folosirea alcoolului; în locul acestuia se poate folosi acetona.

Scanned with OKEN Scanner

4. Mediul de incubare se prepară numai cu tampon acetat, deoarece celelalte tampoane inhibă enzima. 5. Spălarea cu acid acetic are drept scop îndepărtarea falselor precipitate de plumb din țesuturi. Înaintea montării se poate practica o supracolorare a nucleilor și a citoplasmelor.

METODA GROGG-PERASE (de azocuplare, cu alfanaftilfosfat de sodiu și o sare de diazoniu). **Principiul metodei.** Enzima descompune prin hidroliză naftilfosfatul de sodiu în alfanaftol și fosfat acid de sodiu. Naftolul intră în reacție cu sarea de diazoniu, rezultînd prin cuplare simultană un colorant azoic insolubil. **Reactivi:** 1. Mediu de incubare preparat din 100 ml tampon acetat-veronal 0,1 M cu pH 5,0; 75 mg alfa-naftil-1-fosfat sodic; 7,5 g polivinilpirolidon. După dizolvarea acestor substanțe se adaugă 100 mg sare de diazoniu (vezi fosfataza alcalină, metoda Gomori). Amestecul incubator se prepară înainte de întrebuințare și se filtrează. **Tehnica:** 1. Secțiunile se pot obține în mod similar cu metoda precedentă. 2. Se incubează timp de cîteva minute pînă la o oră, la 37°C. 3. Se spală timp de 1—2 minute în apă curentă. 4. Se montează într-un mediu hidrosolubil. **Preparatul de control și cel martor** se pot obține în mod similar ca în metoda precedentă. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în roșu, roșu-brun, albastru-închis etc. în funcție de sarea de diazoniu folosită. **Observații:** 1. Comparativ cu metoda similară pentru fosfataza alcalină, cuplarea în cazul fosfatazei acide este încetinită (din cauza pH-ului acid) și astfel apar mai ușor artefacte de difuziune. Metoda este totuși superioară celei cu plumb. 2. Se poate face o supracolorare a nucleilor înaintea montării.

Scanned with OKEN Scanner

Metoda Burstone (de azocuplare, cu fosfat naftol AS și o sare de diazoniu). **Principiul metodei.** Este identic cu cel din metoda precedentă. **Reactivi:** 1. Mediu de incubare preparat din 4 mg fosfat de naftol AS dizolvat în 0,25 ml N,N'-dimetilformamidă; 25 ml apă distilată; 25 ml tampon acetat 0,2 M cu pH 5,2—5,6. După dizolvare se adaugă 35 mg dintr-o sare de diazoniu (vezi fosfataza alcalină, metoda Gomori), 2 picături dintr-o soluție 10% de clorură de mangan ($MnCl_2$) și se filtrează. **Tehnica:** 1. Secțiunile se obțin în mod similar cu metoda cu plumb. 2. Se incubează timp de 1/2—8 ore, la 37°C sau la temperatura laboratorului. 3. Se spală și se montează într-un mediu hidrosolubil. **Preparatul de control și cel martor** se obțin în mod similar cu metoda Gomori. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în roșu, roșu-brun, albastru-închis etc. în funcție de sarea de diazoniu folosită. **Observații:** 1. Se poate face colorarea citoplasmelor înaintea montării. 2. Dintre toate metodele pentru fosfataza acidă nespecifică, este considerată cea mai precisă.

Metoda de azocuplare cu alfanaftilfosfat de sodiu și o sare de hexazoniu. **Principiul metodei** este identic cu cel al metodelor care folosesc o sare de diazoniu. **Reactivi:** 1. Mediul de incubare este un amestec de 13 ml apă distilată; 5 ml tampon acetat-veronal 0,1 M cu pH 5,0; 20 mg alfanaftilfosfat de sodiu și 1,6 ml soluție de fuxină hexazotată. Cu ajutorul unei soluții de hidroxid de sodiu 1 N (aproximativ 0,5 ml) se ajustează pH-ul la 6,0—6,5 și amestecul se filtrează. Prepararea fuxinei hexazotate: se amestecă la rece cîte 0,8 ml dintr-o soluție de fucsină 4% sau pararosanilină (violet de metil, pioctanină) 4% dizolvate în HCl 2 N (soluțiile se

Scanned with OKEN Scanner

păstrează două luni la frigider) și o soluție de azotat de sodiu $NaNO_3$ 4% (care se păstrează cca o săptămînă la frigider); după amestecare se agită, formîndu-se în decurs de 30—40 secunde sarea de hexazoniu care este ușor gălbuie. **Tehnica:** 1. Secțiunile se obțin în mod similar cu metoda pe bază de plumb. 2. Se incubează timp de 5—30 minute, la temperatura camerei, în mediul de incubare. 3. Se spală cu apă distilată. 4. Se montează într-un mediu hidrosolubil sau anhidru. **Preparatul de control și cel martor** se obțin în mod similar cu metoda cu plumb. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în brun-roșcat. **Observații:** 1. Cantitatea de fuxină hexazotată poate fi redusă la jumătate dacă activitatea fosfatazei acide este slabă. 2. Fuxina sau pararosanilina trebuie să fie de calitate superioară, altfel apar reacții nespecifice.

6. 5-NUCLEOTIDAZA (E.C. 3.1.3.5.)

Metoda Wachstein-Meisel (cu plumb). **Principiul metodei.** Enzima descompune prin hidroliză adenozin-5-fosfatul (acid adenilic) din mediul de incubare, rezultînd ioni de fosfat, care vor fi transformați în fosfat de plumb insolubil, cu ajutorul azotatului de plumb. Acesta din urmă se transformă în sulfură de plumb (neagră), prin tratarea secțiunilor cu sulfură de amoniu. **Reactivi:** 1. Mediu de incubare format din 20 ml soluție 0,125% acid adenilic; 20 ml tris-maleat 0,2 M cu pH 7,2; 3 ml soluție azotat de plumb 2%; 5 ml soluție de sulfat de magneziu 0,1 M; 2 ml apă distilată. Amestecul se filtrează. 2. Soluție de sulfură de amoniu 0,5—1%. **Tehnica:** Secțiunile se obțin la criotom, din material nefixat, fixat în formol-calciu sau fixat în formol tamponat

Scanned with OKEN Scanner

cu adaos de 5% dextran. 2. Se incubează timp de 1/2—2 ore, la 37°C. 3. Se spală cu apă distilată, folosind 4 băi cu o durată totală de un minut. 4. Dacă secțiunile au provenit dintr-un material nefixat, ele se pot fixa acum în formol-calciu timp de 30 minute. 5. Se introduc timp de 1 minut în soluție de sulfură de amoniu. 6. Se spală cu apă distilată. 7. Se montează într-un mediu hidrosolubil. **Preparatul de control.** Avînd în vedere că acidul adenilic este hidrolizat nu numai de către 5-nucleotidaza (numită și AMP-aza), ci și de către fosfataza alcalină, preparatul de control urmărește în primul rînd inhibarea 5-nucleotidazei și punerea în evidență a fosfatazei alcaline. Acest lucru se obține prin adăugarea la substrat a unui compus cu nichel (Ni^{++})10^{-3} M. Nichelul inhibă în mod specific numai 5-nucleotidaza. Concomitent se poate pune în evidență fosfataza alcalină prin metoda Gomori-Takamatsu.

Al doilea preparat de control se obține prin incubarea secțiunilor într-un mediu de incubare fără substrat. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în negru. **Observații:** 1. 5-nucleotidaza este o fosfatază alcalină cu un pH optim de 7,5—8,5 (în medie 7,8). 2. Sulfatul de magneziu (Mg^{++}) este un activator al enzimei. 3. Înnegrirea nucleilor prin această metodă este considerată un artefact.

7. GLUCOZO-6-FOSFATAZA (E.C. 3.1.3.9.)

METODA WACHSTEIN-MEISEL. **Principiul metodei.** Enzima descompune prin hidroliză glucozo-6-fosfatul din mediul de incubare în glucoză și acid ortofosforic. Acidul ortofosforic intră în reacție cu azotatul de plumb, rezultînd fosfat de plumb insolubil, care apoi este transformat în sulfură de plumb (de culoare

Scanned with OKEN Scanner

neagră), cu ajutorul unei soluții de sulfură de amoniu. **Reactivi:** 1. Mediu de incubare compus din soluție apoasă 0,125% de glucozo-6-fosfat, sare de potasiu 20 ml; tampon tris-HCl 0,2 M cu pH 6,7 20 ml; soluție 2% de azotat de plumb 3 ml și apă distilată 7 ml. 2. Soluție de sulfură de amoniu 2%. 3. Formol neutru 10%. **Tehnica:** 1. Secțiunile se obțin numai la rece (criotom, microtom cu congelare, criodesicare), deoarece enzima este foarte sensibilă la căldură, formol și acizi. 2. Se incubează timp de 5—15 minute, la 32°C. 3. Se spală cu apă distilată. 4. Se introduc în soluția de sulfură de amoniu timp de 1 minut. 5. Se spală cu apă distilată. 6. Se recomandă o postfixare în formol neutru 10% timp de 2 minute. 7. Se montează într-un mediu hidrosolubil. **Preparatul de control** se obține fie prin inhibarea enzimei prin introducerea prealabilă a secțiunilor în apă fierbinte, fie prin incubarea într-un mediu la care s-a adăugat ca inhibitor un acid, o florură alcalină sau un arseniat. **Preparatul martor** se poate obține din țesuturi bogate în glucozo-6-fosfatază ca de exemplu ficat, rinichi, intestin (mucoasă). **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în nuanțe de la brun la negru. **Observații:** 1. Fosfataza acidă poate să descompună de asemenea glucozo-6-fosfatul. De aceea se mai pot efectua preparate de control din material fixat (fosfataza acidă rezistă la fixare). Dacă apar înnegriri în aceleași locuri ca în preparatele principale, reacția se datorește fosfatazei acide.

8. DEZOXIRIBONUCLEAZA (E.C. 3.1.4.6.)

Metoda Aronson-Vorbrodt (cu plumb). **Principiul metodei.** Enzima descompune prin hidroliză acidul dezoxiribonucleic. Nucleotizii rezultați vor fi la rîn-

Scanned with OKEN Scanner

dul lor hidrolizați, datorită fosfatazei acide, adăugată la mediul de incubare, formîndu-se ioni de fosfat. Aceştia intră în reacție cu azotatul de plumb rezultînd fosfat de plumb insolubil, care este transformat în sulfură neagră de plumb, cu ajutorul unei soluții de sulfură de amoniu. **Reactivi:** 1. Mediul de incubare conține 1 mg de acid dezoxiribonucleic din timus de vițel (sau un alt preparat de ADN); 2,5 mg fosfat acid (preparat comercial); 6,2 ml tampon acetat 0,2 M cu pH 5,9 sau 5,2; 0,5 ml soluție de azotat de plumb 3,31% (0,1 M) și apă distilată pînă la 25 ml. 2. Soluție de acid acetic 1%. 3. Soluție de sulfură de amoniu 2%. **Tehnica:** 1. Se folosesc țesuturi fixate scurt timp în formol diluat, la rece, secționate la criotom sau microtom cu congelare, sau secțiuni obținute la criotom, lipite pe lame și fixate într-un amestec de formol-apă-acetonă (1 : 4 : 5) timp de 5 minute la —10°C, spălate cu un amestec de acetonă-apă (1 : 1) și apoi cu apă. 2. Secțiunile se incubează timp de ½—3 ore, la 37°C. 3. Se spală cu grijă în apă distilată. 4. Se spală cu soluția 1% de acid acetic. 5. Se introduc timp de 2 minute în soluția de sulfură de amoniu. 6. Se spală cu apă distilată. 7. Se montează într-un mediu anhidru. **Preparatul de control** se obține prin incubare într-un mediu fără substrat. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în negru. **Observații:** 1. Reacția are un caracter „dublu“ deoarece pune în evidență, pe lîngă dezoxiribonuclează, și fosfataza alcalină; de aceea trebuie interpretată cu prudență. 2. Incubarea într-un mediu cu pH 5,9 arată mai ales o localizare lizozomială a dezoxiribonucleazei, incubarea la pH 5,2 mai mult o localizare nucleară. 3. Metoda Aronson-Vorbrodt evidențiază numai dezoxiribonucleaza II (pH optim 4,5—6,0, in-

Scanned with OKEN Scanner

sensibilă la ionii de magneziu), pe cînd dezoxiribonucleaza I (pH optim 7—8, activată de ionii de magneziu) nu este evidenţiată.

9. SULFATAZA (E.C. 3.1.6.1.)

METODA RUTENBURG-SELIGMAN (azocuplare cu benzoil-naftil sulfat şi o sare de diazoniu). **Principiul metodei.** Dintre cele patru tipuri de sulfataze, numai arilsulfataza descompune prin hidroliză 6-benzil-2-naftilsulfatul de potasiu, rezultînd benzoil-naftol, care prin „postcuplare" cu o sare de diazoniu dă un colorant azoic. **Reactivi:** 1. Mediul de incubare se obţine dizolvînd la cald 25 mg 6-benzoil-2-naftil sulfat de potasiu în 80 ml soluţie de clorură de sodiu 0,85%. Se adaugă 20 ml tampon acetat 0,5 M cu pH 6,1. Dacă se prelucrează secţiuni nefixate, atunci se mai adaugă la mediul de incubare încă 2,6 g clorură de sodiu. 2. Soluţie 0,1% dintr-o sare de diazoniu (Fast Blue B) în tampon fosfat 0,05 M cu pH 7,6. **Tehnica:** 1. Se folosesc în general secţiuni la criotom, din material nefixat sau fixat în formol-calciu. 2. Secţiunile provenite din ţesuturi nefixate se spală în trei băi a cîte 2 minute de clorură de sodiu 0,85%; 1% şi 2%. 3. Secţiunile se incubează timp de 2—16 ore, la 37°C. Pentru secţiuni nefixate se foloseşte mediul hipertonic. 4. Spălarea se face în mod diferenţiat: secţiunile din material nefixat se spală în cele trei soluţii saline, în concentraţie descrescîndă (fiecare baie 5 minute), iar secţiunile din material fixat se spală cu apă distilată. 5. Postcuplarea se face la 4°C timp de 5 minute. 6. Secţiunile se spală în trei băi reci (a cîte un minut) de clorură de sodiu 0,85%. 7. Se montează într-un mediu hidrosolubil. **Preparatul de control**

Scanned with OKEN Scanner

se obţine prin incubarea secţiunilor într-un mediu fără substrat sau într-un mediu cu adaos de inhibitori: cianură de potasiu (0,05 M), acid monoiodacetic (0,005 M), florură de sodiu (0,01 M) sau fosfat monosodic (0,003 M). **Preparatul martor** se obţine din ţesuturi cu activitate sulfatazică relativ bogată ca de exemplu ficatul, rinichiul, suprarenala. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în albastru, cele cu activitate mai redusă în purpuriu sau roşu. **Observaţii:** 1. Se preferă postcuplajul şi nu cuplarea simultană, deoarece benzoil-naftolul prezintă o relativă solubilitate şi tendinţă de difuziune.

10. BETAGLUCURONIDAZA (E.C. 3.2.1.31.)

METODA SELIGMAN-TSOU-RUTEMBURG-COHEN (postcuplare cu 6-brom-2-naftil-beta-D-glucuronid şi sare de diazoniu). **Principiul metodei.** Betaglucuronidaza catalizează hidroliza legăturii betaglucozidice a 6-brom-2-naftil-beta-D-glucuronidului, punînd în libertate 6-brom-2-naftolul, care este insolubil şi se leagă prin postcuplare cu o sare de diazoniu, rezultînd un colorant azoic.

Reactivi: 1. Mediu de incubare preparat prin dizolvarea a 30 mg de 6-brom-2-naftil-beta-D-glucuronid în 5 ml alcool metilic absolut, adăugîndu-se 20 ml tampon citrat-fosfat cu pH 4,95 şi 75 ml apă distilată. 2. Soluţie 0,1% de Fast Blue B în tampon fosfat rece 0,02 M cu pH 7,5. 3. Soluţie de acid acetic 0,1%. 4. Mediu de montare hidrosolubil. **Tehnica:** 1. Se foloseşte un material fixat pentru scurt timp în formol neutru 10% rece, secţionat la microtomul cu congelare (secţiunile se spală în apă rece pentru îndepărtarea formolului) sau material ne-

Scanned with OKEN Scanner

fixat, secționat la criotom, secțiunile fiind fixate apoi scurt timp (10 minute) în formol rece și spălate 15 minute în apă rece pentru îndepărtarea formolului. 2. Secțiunile se incubează timp de 4—6 ore, la 37°C. 3. Se spală aproximativ un minut în apă distilată. 4. Se introduc timp de 5 minute la 4°C în soluția proaspătă de Fast Blue B. 5. Se spală timp de cîteva secunde în două băi de apă distilată rece. 6. Se spală cîteva secunde în acid acetic 0,1% (facultativ). 7. Se montează într-un mediu hidrosolubil. **Preparatul de control** se obține prin incubare într-un mediu fără substrat sau într-un mediu la care s-a adăugat un inhibitor specific ca de exemplu 1,4-zaharolactonă 0,001 M, acid citric, maleic, ascorbic, heparină. **Preparatul martor** se poate obține din organe și țesuturi bogate în beta-glucuronidază ca de exemplu splina, ficatul, corpii galbeni, ganglionii limfatici, timusul, rinichiul, tiroida, epididimul etc. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în albastru, pe cînd lipidele prezintă o colorație roșie. **Observații:** 1. Există pericolul difuzării derivatului naftolic. Totuși metoda dă rezultate bune, dependente de calitatea substratului.

METODA HAVASHY-NAKAYIMA-FISHMAN (azocuplare cu naftol as-bi-glucuronid și fuxină hexazotată). **Principiul metodei.** Enzima catalizează hidroliza naftol AS-BI-glucuronidului (care trebuie sintetizat în laborator), punînd în libertate naftolul AS-BI care se cuplează cu sarea de hexazoniu, rezultînd un colorant azoic. **Reactivi:** 1. Fixator compuns dintr-o soluție 0,88 M de zaharoză cu adaos de 1% gumă arabică. Se conservă la frigider, după ce s-a adăugat 0,1 g timol/litru soluție. 2. Mediu de incubare format din 0,6 ml fuxină hexazotată (vezi

Scanned with OKEN Scanner

pag. 242); 10 ml soluție substrat, hidroxid de sodiu 1 N pentru ajustarea pH-ului la 5,2 și apă distilată pînă la 20 ml. Amestecul se filtrează. Soluția substrat se prepară din 28 mg naftol-AS-BI-glucuronid care se dizolvă în 1,2 ml soluție bicarbonat de sodiu 0,05 M (420 mg $NaHCO_3$ în 100 ml apă distilată) și se completează cu tampon acetat 0,2 N (pH 5,0) pînă la 100 ml. Această soluție substrat poate fi păstrată la temperatura camerei timp de cîteva săptămîni. **Tehnica:** 1. Se folosesc piese subțiri care se fixează la rece, timp de 24 ore, în formol-calciu. În continuare se introduc în soluția de zahăr-gumă arabică, la +4°C și se lasă 24 de ore. Piesele pot fi păstrate în această soluție mai multe luni fără ca activitatea enzimatică să scadă prea mult. Se secționează la microtomul cu congelare. 2. Secțiunile se incubează aproximativ 30 minute, la 37°C. 3. Se spală cu apă distilată. 4. Se montează într-un mediu hidrosolubil sau anhidru. **Preparatul de control și cel martor** se obțin ca în metoda precedentă. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în roșu. **Observații:** 1. Metoda dă rezultate mai bune decît cea precedentă deoarece produsul de reacție are o solubilitate redusă. 2. **Sinteza naftol-AS-BI-glucuronidului.** Naftolul-AS-BI din comerț se purifică prin recristalizare după dizolvare într-un amestec de alcool-cărbune. Din acest produs purificat se dizolvă 4,46 g în 10 ml etanol absolut care conține un adaos de 0,67 g hidroxid de potasiu. Se adaugă 4 g acetil-brom-metil-glucuronat. Amestecul se păstrează într-un vas închis la temperatura camerei timp de o săptămînă. După aceea se amestecă cu un litru apă distilată și se adaugă 280 ml cloroform. Extractul cloroformic va fi spălat de trei ori cu cîte 100 ml de hidroxid de potasiu 2 N și cu

Scanned with OKEN Scanner

300 ml apă distilată. Pentru uscare se trece prin sulfat de sodiu anhidru și ulterior prin vid. Reziduul se dizolvă în 50 ml metanol și se precipită cu ajutorul unei soluții de hidroxid de bariu fierbinte (10 g $Ba(OH)_2 \times 8\ H_2O$ se dizolvă în 200 ml apă distilată și se filtrează). Precipitatul obținut este sarea galbenă de bariu diacetilată. După 24 de ore precipitatul este așezat într-o pîlnie Büchner și spălat cu 50 ml metanol rece. Se spală de 3 ori cu cîte 10 ml acid clorhidric 1,25 N și cu 50 ml apă distilată rece. La precipitatul obținut se adaugă 200 ml soluție bicarbonat de sodiu 1%. Se filtrează și la filtrat se adaugă acid clorhidric 1,25 N, precipitîndu-se naftolul-AS-BI-glucuronidul (acid), sub formă de precipitat alb gelatinos. Se filtrează din nou și precipitatul recoltat pe filtru se usucă la aer și se recristalizează într-un amestec de 75 ml metanol cu 25 ml apă distilată. Ulterior se recristalizează de mai multe ori în metanol.

11. ALFA-GLUCORONIDAZA (E.C. 3.2.1.20.)

Metoda Rutemburg și col. (postcuplare cu 6-brom-2-naftil-alfa-D-glucozid și o sare de diazoniu). **Principiul metodei.** Alfa-glucozidaza catalizează hidroliza 6-brom-2-naftil-alfa-D-glucozidului, punînd în libertate 6-brom-2-naftol care este insolubil și se leagă prin postcuplare cu o sare de diazoniu, rezultînd un colorant azoic. **Reactivi:** 1. Mediu de incubare preparat din 1—1,5 mg de 6-brom-2-naftil-alfa-D-glucozid (glucopiranozid) care se dizolvă într-un ml de etanol și se adaugă 9 ml tampon fosfat 0,025 M cu pH 6,5. 2. Soluție 0,1% de Fast Blue B în tampon fosfat cu pH 7,5. **Tehnica:** 1. Se folosește material fixat în formol neutru rece,

Scanned with OKEN Scanner

secţionat la microtomul cu congelare. Secţiunile se spală în apă rece. 2. Se incubează timp de 1—2 ore, la 37°C, în mediul de incubare. 3. Se spală în apă distilată. 4. Se introduc în soluţia de sare de diazoniu, timp de 2 minute. 5. Se spală cu apă distilată. 6. Se montează într-un mediu hidrosolubil. **Preparatul de control** se obţine prin incubare într-un mediu fără substrat. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în albastru, violet sau purpuriu.

12. BETA-GLUCOZIDAZA (E.C. 3.2.1.21.)

Metoda Lojda (cu colorant indoxilic). **Principiul metodei.** Enzima descompune prin hidroliză derivatul indoxilic al beta-D-glucozidului, eliberîndu-se indoxil, care se transformă în albastru de indigo insolubil, datorită prezenţei oxigenului atmosferic molecular. **Reactivi:** 1. Mediu de incubare preparat din 3 mg de 5-brom-4-cloroindoxil-3-beta-D-glucozid, care se dizolvă în 0,3 ml dimetilformamidă, se adaugă 0,5 ml soluţie fericianură de potasiu 1,65% şi 0,5 ml soluţie ferocianură de potasiu 2,11% (amestecul de cianuri grăbeşte oxidarea indoxilului). Amestecul se agită bine şi se filtrează. Se poate păstra mai multe zile la frigider. Pentru majoritatea ţesuturilor, pH-ul potrivit este de 3,1—5,0. **Tehnica:** 1. Se foloseşte material proaspăt secţionat la criotom sau material fixat în formol-calciu rece şi secţionat la microtomul cu congelare. 2. Secţiunile se incubează timp de 30 minute—24 ore, la 37°C. 3. Se spală cu apă distilată. 4. Se montează într-un mediu hidrosolubil sau anhidru. **Preparatul de control** se obţine prin incubare într-un mediu fără substrat. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în albastru.

Scanned with OKEN Scanner

13. BETA-GALACTOZIDAZA (E.C. 3.2.1.23.)

METODA RUTEMBURG (postcuplare, cu 6-brom-2-naftil beta-D-galactozid și o sare de diazoniu). **Principiul metodei.** Beta-galactozidaza catalizează hidroliza 6-brom-2-naftil-beta-D-galactozidului, punînd în libertate 6-brom-2-naftolul care este insolubil și se leagă prin postcuplare cu o sare de diazoniu, rezultînd un colorant azoic. **Reactivi:** 1. Mediu de incubare preparat din 100 mg 6-brom-2-naftil-beta-D-galactozid (galactopiranozid) care se dizolvă în 15 ml metanol, se adaugă 200 ml apă distilată fierbinte (70°C), se lasă să se răcească și se adaugă 85 ml tampon fosfat-citrat cu pH 4,95. 2. Soluție 0,1% de Fast Blue B în tampon fosfat rece 0,02 M cu pH 7,4—7,8. **Tehnica:** 1. Se folosește material fixat în formol neutru rece și secționat la microtomul cu congelare sau material proaspăt secționat la rece, cu fixare ulterioară a secțiunilor în formol rece. Secțiunile se spală 15 minute în apă rece pentru îndepărtarea formolului. 2. Se incubează timp de 1—4 ore, la 37°C, în mediul de incubare. 3. Se spală în 3 băi de apă distilată a cîte 3 minute fiecare. 4. Se introduc în soluția de sare de diazoniu, timp de 3—5 minute, la +4°C. 5. Se spală în 3 băi de apă distilată rece. 6. Se montează într-un mediu hidrosolubil. **Preparatul de control** se obține prin incubare într-un mediu fără substrat. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în albastru, violet sau purpuriu.

14. LEUCIN-AMINOPEPTIDAZA (E.C. 3.4.1.1.)

METODA ACKERMAN (azocuplare cu alanil-beta-naftilamidă și o sare de diazoniu). **Principiul metodei.** Leucin-aminopeptidaza hidrolizează aminoacizii de

Scanned with OKEN Scanner

tipul leucinei, eliberînd naftilamida care se cuplează prin reacție simultană cu o sare de diazoniu, rezultînd un colorant azoic. **Reactivi:** 1. Mediu de incubare format din 40 mg alanil-beta-naftilamidă; 50 ml apă distilată; 50 ml tampon fosfat 0,1 M cu pH 6,7; 5 mg sulfat de magneziu și 50 mg sare de diazoniu (de obicei Fast Garnet GBC). **Tehnica:** 1. Se folosește material proaspăt secționat la criotom; secțiunile se aplică pe lame. Secțiunile se pot obține și din material criodesicat, inclus în parafină, evitînd folosirea de alcool și hidrocarburi benzenice; în sfîrșit, se poate întrebuința un material fixat scurt timp în formol neutru 10%, secționat la rece, secțiunile fiind spălate abundent pentru îndepărtarea fixatorului. 2. Secțiunile se incubează timp de 4—6 ore, la 20—25°C. 3. Se spală 1—2 minute în apă curentă. 4. Se montează într-un mediu hidrosolubil. **Preparatul de control** se obține prin inhibarea prealabilă a activității enzimatice cu EDTA sau citrat de sodiu 0,01 M. **Preparatul martor** se obține dintr-un țesut bogat în leucin-aminopeptidază ca de exemplu, rinichiul și intestinul subțire (mucoasa). Țesuturile mai puțin bogate sînt mușchii, pielea, SNC, splina și ganglionii limfatici. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în roșu (precipitat granulos, chiar cristalin). **Observații:** 1. După B u r s t o n e și F o l k se poate folosi un mediu de incubare format din 10 mg 1-leucin-beta-naftilamidă; 40 ml apă distilată; 10 ml tampon tris cu pH 7,1 și 30 mg sare de diazoniu roșie. Incubarea are loc la temperatura camerei, timp de 15 minute pînă la 3 ore.

METODA NACHLAS-CRAWFORD-SELIGMAN (de azocuplare, cu leucil-beta-naftilamidă și o sare de diazoniu). **Principiul metodei** este identic cu cel din metoda precedentă. În loc de Fast Garnet GBC se folo-

Scanned with OKEN Scanner

seşte Fast Blue B, care dă un colorant azoic capabil să fixeze prin chelare ionii de cupru, ceea ce intensifică culoarea, iar preparatul devine rezistent la hidrocarburi benzenice şi poate fi montat într-un mediu anhidru. **Reactivi:** 1. Mediu de incubare format din 50 ml tampon acetat 0,1 M cu pH 6,5; 40 ml soluţie clorură de sodiu 0,8%; 5 ml soluţie de cianură de potasiu 0,02 M (1,3 g/1); 5 ml soluţie 0,8% de leucil-beta-naftilamidă în apă distilată şi 50 mg Fast Blue B. 2. Soluţie apoasă de clorură de sodiu 0,8%. 3. Soluţie apoasă de sulfat de cupru 0,1 M. **Tehnica:** 1. Se folosesc secţiuni obţinute în mod similar ca în metoda precedentă. 2. Se incubează timp de 20 minute pînă la 4 ore, la 37°C. 3. Se spală cu clorură de sodiu 0,8% timp de 2 minute. 4. Se introduc timp de 2 minute în soluţie de sulfat de cupru. 5. Se spală cu clorură de sodiu 0,8%. 6. Se fixează timp de 2—4 ore, la +4°C, în formol 10%. 7. Se deshidratează cu alcool absolut, se clarifică cu xilol şi se montează într-un mediu anhidru. **Preparatul de control şi cel martor** se obţin ca în metoda precedentă. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în albastru sau albastru-violet. **Observaţii:** 1. Cianura de potasiu este în acest caz un activator al enzimei. 2. În loc de leucil-beta-naftilamidă se poate folosi şi alanil-beta-naftilamidă, indicînd activitatea alanil-aminopeptidazei. 3. Într-o altă variantă, N a c h l a s şi col. au folosit următorul mediu de incubare: 10 ml tampon acetat 0,1 M cu pH 6,5; 50 ml soluţie clorură de sodiu 0,85%; 35 ml soluţie cianură de potasiu 0,02 M (1, 3 g/1); 5 ml soluţie 0,4% de leucil-4-metoxi-2-naftilamidă şi 50 mg Fast Blue B. Fazele de lucru sînt identice cu cele din metoda expusă mai sus. Produsul care indică activitatea enzimatică este de culoare roşie.

Scanned with OKEN Scanner

15. ADENOZINTRIFOSFATAZA SAU ATP-aza (E.C. 3.6.1.4.)

METODA PADIKULA-HERMAN (cu calciu-cobalt). **Principiul metodei.** Adenozintrifosfatazele descompun prin hidroliză adenozintrifosfatul (ATP-ul) în adenozindifosfat (ADP) și acid ortofosforic. Acidul fosforic intră în reacție cu clorura de calciu, rezultînd fosfat de calciu insolubil care este transformat în fosfat de cobalt cu ajutorul unei soluții de clorură de cobalt. În continuare, prin prelucrarea secțiunilor cu sulfură de amoniu, fosfatul de cobalt (substanță cromogenă) este transformat în sulfură de cobalt (substanță cromoforă) de culoare neagră sau neagră-brună. **Reactivi:** 1. Mediu de incubare format din 20 ml tampon veronal sodic 0,1 M (2,062 g/100 ml): 10 ml soluție de clorură de calciu 0,18 M (1,998 g/100 ml); 30 ml apă distilată și 152 mg adenozintrifosfat sare sodică. După dizolvare se ajustează pH-ul la 9,4 cu ajutorul unei soluții de hidroxid de sodiu 0,1 M, se completează la 100 ml cu apă distilată și la nevoie se filtrează. 2. Soluție clorură de calciu 1%. 3. Soluție clorură de cobalt 2%. 4. Soluție sulfură de amoniu 1,5—2%. **Tehnica:** 1. Se folosește material proaspăt sau fixat scurt timp în formol neutru 10% la rece, făcîndu-se secțiuni la microtomul cu congelare. Se poate întrebuința și material criodesicat, inclus în parafină. 2. Secțiunile se incubează timp de 5 minute—3 ore, la 37°C. Se spală în trei băi de clorură de calciu 1%, durata totală fiind de 10 minute. 4. Se introduc timp de 3 minute în clorura de cobalt 2%. 5. Se spală cu grijă în apă distilată 6. Se introduc 1—2 minute în soluția de sulfură de amoniu. 7. Se spală cu apă curentă. 8. Se montează într-un mediu hidrosolubil sau anhidru.

Scanned with OKEN Scanner

Preparatul de control. Pe lîngă secțiuni incubate într-un mediu fără substrat se mai impune diferențierea activității enzimatice a ATP-azei de cea a fosfatazei alcaline, deoarece ambele hidrolizează ATP-ul. În acest scop se pot trata în prealabil secțiuni cu BAL (2, 3-dimercapto-1-propanol) soluție 0,0049 M timp de 30—40 minute sau cu cisteină care inhibă puternic fosfataza alcalină și activează, din contră, ATP-aza. Inhibator al ATP-azei este p-cloromercuri-benzoatul 0,0025 (15 minute). **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în negru sau negru-brun. **Observații:** 1. Se admite o supracolorare a citoplasmelor și a nucleilor. Colorarea nucleilor prin însăși metoda Padikula-Herman se consideră un artefact. 2. Pe secțiunile nefixate apar întotdeauna artefacte de difuzare și localizarea intracelulară a enzimei deseori nu poate fi pusă în evidență. Mai bogate în ATP-ază sînt mitocondriile (țesut nefixat) și plasmalema.

METODA WACHSTEIN-MEISEL (cu plumb). **Principiul metodei.** ATP-aza descompune prin hidroliză ATP-ul din mediul de incubare, rezultînd ioni de fosfat care vor fi transformați în fosfat de plumb insolubil cu ajutorul azotatului de plumb. Acesta din urmă se transformă în sulfură de plumb (neagră) prin prelucrarea secțiunilor cu sulfură de amoniu. Principiul și tehnica metodei sînt similare cu cele din metoda Wachstein-Meisel pentru 5-nucleotidază, cu deosebirea că în loc de adenozin-5-fosfat (pentru 5-nucleotidază) se folosește adenozin-3-fosfat (pentru ATP-ază). Locurile cu acțiune enzimatică apar colorate în negru.

Scanned with OKEN Scanner

Metoda Daoust (cu film-substrat). **Principiul metodei.** Ribonucleaza catalizează descompunerea hidrolitică a ribonucleatului de sodiu în nucleotizi. Nucleatul nedescompus se colorează cu coloranți bazici, iar zonele cu activitate enzimatică rămîn necolorate. **Reactivi:** 1. Film-substrat pregătit în felul următor: se prepară o soluție 5% de gelatină, se încălzește la 60°C și se amestecă în părți egale cu o soluție de ribonucleat de sodiu 10%. Se depun pe o lamă 3—5 picături și se întind rapid; excesul se scurge pe o hîrtie de filtru. „Filmul" astfel obținut va fi uscat la temperatura camerei, fixat timp de 18—20 ore la 50°C în formol neutru 20%, spălat în trei băi de apă distilată a cîte 5 minute și uscat la temperatura camerei. 2. Soluție 0,2% de albastru de toluidină. **Tehnica:** 1. Se folosește material proaspăt secționat la criotom. 2. Secțiunile, cu o grosime de 15 microni se așază pe lame cu film-substrat. 3. Lamele se țin în palmă pînă cînd secțiunile aderă de film. 4. Se incubează timp de 5—60 minute, la temperatura camerei, într-o atmosferă saturată cu vapori de apă. 5. Se fixează în formol 20% timp de 10 minute. 6. Se spală în trei băi de apă distilată a cîte 2 minute fiecare. 7. Se colorează timp de 15 minute cu soluția de albastru de toluidină. 8. Se spală în trei băi de apă distilată a cîte 5 minute fiecare. 9. Se usucă și se montează în balsam de Canada. **Preparatul de control** se obține prin inactivare prealabilă timp de 20 minute (înaintea incubării) într-o soluție de clorură de magneziu ($MgCl_2$) 0,05 M. **Rezultat:** Sub influența soluției de albastru de toluidină, filmul-substrat se colorează în albastru, cu excepția zonelor

Scanned with OKEN Scanner

cu activitate enzimatică, care rămîn clare. **Observaţii:** 1. Metoda Daoust nu este propriu-zis o metodă histochimică, deoarece nu permite un adevărat studiu histologic, la nivel de celulă. În rest însă ea poate fi calificată drept o metodă rapidă, comodă, cu rezultate nete.

METODA LAGUERRIÈRE-LAUMONIER (pentru ribonucleaza acidă). **Principiul metodei.** Enzima descompune prin hidroliză acidul ribonucleic, rezultînd ioni de fosfat, care intră în reacţie cu azotatul de plumb. Precipitatul de fosfat de plumb va fi transformat în sulfură neagră de plumb, cu ajutorul unei soluţii de sulfură de amoniu. **Reactivi:** 1. Mediu de incubare format din ARN 10 mg; tampon acetat 0,2 M cu pH 5,9, 12,5 ml; soluţie azotat de plumb 0,4 M 0,25 ml şi apă distilată pînă la 50 ml. Se ajustează pH-ul la 5,9. 2. Acid acetic 1%. 3. Soluţie de sulfură de amoniu 1%. **Tehnica:** 1. Se foloseşte material proaspăt secţionat la criotom (7—10 microni). 2. Secţiunile se usucă 30—60 minute la temperatura camerei. 3. Se incubează timp de 3—5 ore la 37°C. 4. Se spală rapid în apă distilată. 5. Se introduc în acid acetic 1% timp de 1 minut. 6. Se introduc în soluţia de sulfură de amoniu timp de 2 minute. 7. Se spală 2 minute în apă distilată. 8. Se deshidratează, se usucă, se clarifică şi se montează în balsam de Canada. **Preparatul de control** se obţine prin incubare într-un mediu fără ARN. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar sub formă de granule negre foarte fine. **Observaţii:** 1. Se poate efectua o supracolorare a citoplasmelor cu o soluţie de verde-lumină 1%.

Scanned with OKEN Scanner

17. FOSFOAMIDAZA (E.C. 3.9.1.1.)

Metoda Gomori (cu plumb). **Principiul metodei.** Enzima descompune prin hidroliză amidele fosforice (aici cloranilidofosfonat de amoniu) rezultînd ioni de fosfat, care cu ajutorul azotatului de plumb se transformă în fosfat de plumb insolubil. Acesta este transformat în sulfură neagră de plumb, cu ajutorul unei soluții de sulfură de amoniu. **Reactivi:** 1. Mediu de incubare compus din 2 ml soluție de p-cloranilidofosfonat de amoniu 0,1 M; 50 ml tampon maleic cu pH 5,6; 1,5 ml soluție azotat de plumb 0,1 M și cîteva picături soluție 10% de clorură de magneziu. Acest amestec se păstrează timp de 30 minute la etuvă la 60°C și se filtrează. Tamponul maleic se prepară din 5,8 g acid maleic care se dizolvă în 500 ml apă, se adaugă 62 ml hidroxid de sodiu 1 N și se completează la 1000 ml. 2. Soluție de sulfură de amoniu 1,5—2,0%. **Tehnica:** 1. Se folosesc secțiuni lipite pe lamă, obținute din material criodesicat sau fixat cu acetonă și prelucrate în parafină. Se recomandă colodionarea secțiunilor. 2. Se incubează timp de 2—8 ore, la aproximativ 40°C în mediul de incubare. În acest timp lamele se așază cu fața (secțiunea) în jos. 3. Se spală cu apă distilată. 4. Dacă precipitatele albe sînt foarte abundente, lamele se spală cu tampon citric sau acetic 0,1 M cu pH 4,5 pînă la dizolvarea precipitatului difuz care acoperă secțiunile și se clătesc cu apă curentă. 5. Se introduc în soluția de sulfură de amoniu timp de 1—2 minute. Se spală cu apă curentă. 7. Se montează într-un mediu hidrosolubil sau anhidru. **Preparatul de control** se poate obține prin scufundarea lamelor, înaintea deparafinării secțiunilor, în acid azotic 10% timp de 90 minute. **Preparatul martor** se ob-

Scanned with OKEN Scanner

ţine dintr-un ţesut bogat în fosfoamidază, de exemplu, creierul de şoarece. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în negru. **Observaţii:** 1. Se admite o supracolorare a nucleilor şi a citoplasmelor înaintea montării. 2. În timpul pregătirii ţesutului în vederea incubării, se evită complet folosirea alcoolului deoarece acesta inhibă enzima. În locul alcoolului se foloseşte acetona. 3. **Varianta Meyer-Weinmann** foloseşte ca substrat p-cloranilidofosfonat de sodiu care este mai solubil decît sarea de amoniu. Substratul se prepară în laborator dizolvînd 2,08 g acid pentacloranilidofosfonic în 15 ml soluţie hidroxid de sodiu 1 N, completînd pînă la 100 ml cu apă distilată. Mediul de incubare se prepară în felul următor: se dizolvă 534 mg acid maleic în 5 ml hidroxid de sodiu 1 N, se completează cu apă distilată la 100 ml, se adaugă 175 mg clorură de sodiu şi 94 mg azotat de plumb, se încălzeşte uşor pînă la dizolvarea precipitatului, se răceşte, se filtrează, se adaugă 4,5 ml din soluţia de substrat, se încălzeşte la 44°C şi se filtrează. Incubarea are loc la 42°C, timp de 3 ore sau mai mult.

G. METODE PENTRU CLASA TRANSFERAZE

1. FOSFORILAZA (AMILO-1,4-TRANSGLUCOZIDAZA SAU „FOSFORILAZA" CU E.C. 2.4.1.1. ŞI AMILO-1,4-1,6-TRANSGLUCOZIDAZA SAU „BRANCHING FACTOR" CU E.C. 2.4.1.18.)

METODA TAKEUCHI DE NEOFORMARE A POLIZAHARIDELOR. **Principiul metodei.** Fosforilaza catalizează formarea de polizaharide din glucozo-1-fosfat, „glicogenul" neoformat fiind pus în evidenţă cu soluţia Lugol,

Scanned with OKEN Scanner

cu care dă o culoare albastră. **Reactivi:** 1. Mediu de incubare preparat din 50 mg glucozo-1-fosfat, sare de potasiu; 10 mg adenozin-5-fosfat (acid adenilic); 2 mg glicogen (facultativ); 15 ml apă distilată; 10 ml tampon acetat 0,1 M cu pH 5,6—6,0 și 1—2 picături de insulină (10 U/ml). Amestecul poate fi păstrat numai cîteva zile. 2. Soluție Lugol originală diluată 1 : 30 **Tehnica:** 1. Se folosește țesut proaspăt secționat la rece. Secțiunile să aibă o grosime de 15—40 microni în funcție de intensitatea activității enzimatice. 2. Secțiunile se introduc timp de 1—3 ore, la 37°C, în mediul de incubare. 3. Se spală rapid în alcool etilic de 40°. 4. Se spală cu apă distilată. 5. Se aplică pe lame și se lasă să se usuce. 6. Se fixează aproximativ 3 minute în alcool etilic absolut și se lasă să se usuce la aer. 7. Se tratează timp de 5—10 minute cu soluție Lugol diluată. 8. Se montează într-un mediu hidrosolubil și se lutează. **Preparatul de control** se obține prin incubare într-un mediu fără glucozo-1-fosfat. **Preparatul martor** se obține din țesuturi bogate în fosforilază ca de exemplu țesutul hepatic și musculatura. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică determinată de fosforilază apar colorate în albastru; activitatea „branching factor"-ului este reprezentată de un precipitat violet, roșu-violet sau roșu-brun. **Observații:** 1. Glicogenul preexistent în secțiune apare colorat în roșu-brun, dar în general el dispare complet în timpul incubației. 2. Adaosul de insulină și de adenozin-5-fosfat la mediul de incubare are scopul de a activa enzima, iar glicogenul inițiază neoformarea de polizaharid (deci are un rol de „starter"), deoarece glucozofosfatul este atacat numai în prezența unor molecule deja existente de polizaharide. 3. Fosforilaza (E.C. 2.4.1.1.) determină forma-

Scanned with OKEN Scanner

rea de lanțuri neramificate de polizaharide, iar „branching factor" (E.C. 2.4.1.18.) determină formarea de lanțuri ramificate. 4. Activitatea enzimatică a fosforilazei poate fi detectată și prin reacția PAS (de identificare a mucopolizaharidelor neutre). 5. Metoda Takeuchi este o metodă sigură și dă rezultate fidele, cu toate că după 6—7 zile colorația începe să dispară. 6. Pentru a deosebi activitatea fosforilazei de cea a „branching factor"-ului se pot efectua diferite probe suplimentare. Astfel se adaugă la mediul de incubare alcool etilic (20%) sau clorură mercurică (0,0001 M); fosforilaza rezistă la tratamentul cu aceste substanțe și deci în final va apare precipitatul albastru care indică activitatea enzimatică, pe cînd „branching factor"-ul este inhibat. O altă probă care se execută înaintea fixării secțiunilor în alcool etilic absolut constă într-o digestie timp de 30 minute—10 ore, la 37°C, folosindu-se o soluție 0,5% de alfa-amilază (cu pH 5,5—6,0) și beta-amilază (cu pH 4,0). Fosforilaza este inhibată atît de alfa-, cît și de beta-amilază, pe cînd „branching factor"-ul este inhibat numai de către alfa-amilază.

H. METODE PENTRU CLASA LIAZE

1. ANHIDRAZA CARBONICĂ (E.C. 4.2.1.1.)

METODA KURATA, VARIANTA GOEBEL-PUCHTLER. **Principiul metodei.** Anhidraza carbonică catalizează formarea acidului carbonic din CO_2 și H_2O (precum și procesul invers). Pentru a îngrădi descompunerea acidului carbonic în HCO_3^- și H^+ se adaugă mediului de incubare bicarbonat de sodiu. Acidul carbonic rezul-

tat în urma activității anhidrazei carbonice va fi transformat în carbonat de cobalt insolubil, iar acesta, la rîndul lui, în sulfură de cobalt neagră. **Reactivi:** 1. Mediu de incubare reprezentat de o soluție 8% de bicarbonat de sodiu cu adaos de 1% clorură de cobalt ($CoCl_2$). Amestecul se filtrează. 2. Soluție de sulfură de amoniu 0,5—1%. **Tehnica:** 1. Se folosește țesut proaspăt secționat la rece. Secțiunile se introduc imediat în acetonă rece, unde se fixează timp, de o oră. 2. Se spală în apă distilată. 3. Se incubează timp de 1/2—1 oră, la temperatura camerei, în mediu de incubare. 4. Se spală în mai multe băi de apă distilată, durata totală a spălării fiind de 2 minute. 5. Se introduce timp de 1—2 minute în soluție de sulfură de amoniu. 6. Se spală în apă distilată (două băi a cîte un minut). 7. Se montează într-un mediu hidrosolubil sau anhidru. **Preparatul de control** se poate obține prin tratarea prealabilă cu un inhibitor specific, de exemplu Diamox sare de sodiu 0,004 M sau cianură de potasiu 1/10 000. **Preparatul martor** se obține din țesuturi bogate în anhidrază carbonică, ca de exemplu mucoasa stomacală, glandele genitale accesorii, rinichii. **Rezultat:** Locurile cu activitate enzimatică apar colorate în negru. **Observații:** 1. Foarte mulți autori (Pearse, Arvy, Barka și Anderson, Lillie, precum și Lutwack-Mann, Böring și Fand și col. citați de Gabe) sînt de părere că metoda nu este demnă de încredere, că rezultatele prezintă o specificitate nesatisfăcătoare.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL VIII

GLUCIDELE

Datorită marii lor varietăţi şi complexităţi structurale, glucidele constituie pentru investigaţia histochimică un domeniu deosebit de vast. Pentru evidenţierea ozelor, substanţe foarte difuzibile şi deci greu de conservat în secţiuni, dispunem de un număr foarte redus de metode. În schimb, pentru evidenţierea holozidelor (oligo şi polizaharide) şi a heterozidelor (glicoproteine şi glicolipide), tehnica histochimică abundă în metode foarte variate şi complexe. În diferitele structuri celulare şi tisulare coexistă, în majoritatea cazurilor, mai multe tipuri de glucide, astfel că sînt foarte rare cazurile în care să putem ajunge la o concluzie corectă prin aplicarea unui singur procedeu tehnic. De cele mai multe ori, pentru a putea defini un anumit component glucidic este necesar să aplicăm, în mod sistematic, mai multe metode histochimice prin care să precizăm mai întîi apartenenţa la o anumită grupă de glucide şi apoi să facem diferenţierea faţă de glucide apropiate ca structură sau faţă de substanţa de altă natură, dar cu care se aseamănă prin radicali sau funcţii comune. Tehnicile aplicate trebuie la rîndul lor verificate, sub aspectul semnificaţiei, prin diferite teste de blocaj, extracţie etc. Reuşita unei ase-

Scanned with OKEN Scanner

menea acţiuni este condiţionată în mare măsură de pretratamentul adecvat al probelor şi în special de alegerea corectă a fixatorului.

A. FIXAREA

Problema stabilirii fixatorilor adecvaţi se pune în corelaţie cu tehnicile histochimice care urmează să se efectueze.

Fixarea ozelor este dificil de realizat fiind vorba de substanţe cu moleculă mică şi deci foarte difuzibile. Singura fixare satisfăcătoare pentru glucoză, unele hexoze şi pentoze, este precipitarea cu o sol. saturată de hidroxid de bariu în metanol.

Fixarea polizaharidelor. Glicogenul existînd sub mai multe forme în funcţie de gradul de polimerizare, se fixează foarte inconstant, fapt ce explică foarte numeroasele soluţii propuse. Se admite, în general, că în afară de solubilitatea glicogenului, mai ales a tipurilor cu un grad de polimerizare mai redus, intervine şi gradul de fixare a proteinelor citoplasmatice cu care glicogenul este asociat. De regulă generală, toate fixările cu agenţi chimici, cu excepţia clorurii de cetilpiridină, sînt mult ameliorate dacă decurg la rece (0—4°C).

Alcoolul etilic absolut conservă satisfăcător glicogenul, dar numai sub aspect cantitativ, căci deplasările mari intracelulare pe care le produce sînt inacceptabile. Amestecul Carnoy, pentru lucrările de rutină, este mult mai corespunzător.

Fixatorii pe bază de acid picric, probabil şi datorită efectului lor asupra edificiului macromolecular proteic, dau rezultate foarte bune chiar şi pentru glicogenii mai labili. Se utilizează amestecurile

Scanned with OKEN Scanner

Geandre (pag. 27) sau Rossman (pag. 60) la rece (după Lison chiar la temperatura amestecului de acetonă -CO_2).

Formolul simplu nu este satisfăcător, ci doar sub formă de alcool-formol sau formol 10% conținînd acid periodic în proporție de 1%. Amestecurile pe bază de sublimat sau crom nu sînt indicate.

Pentru lucrări de precizie se va da preferință tehnicilor cu congelare. Prelucrarea unor probe de dimensiuni mici prin procedeul de congelare — deshidratare, urmată de fixarea cu vapori de formaldehidă asigură, după E. Pearse, conservarea cea mai corectă a glicogenului. Rezultate echivalente se obțin și prin procedeul de congelare — substituție (în amestec Geandre sau Rossman). Rezultate foarte bune se obțin și prin secționarea la criotom și fixarea secțiunilor cu unul din agenții chimici recomandați.

În aprecierea fixării vom avea în vedere pe de o parte conservarea cantitativă, iar pe de altă parte, aspectul intracelular al glicogenului. Într-o fixare corectă glicogenul trebuie să apară sub formă de granule foarte mici, uniform dispersate în citoplasmă. Sînt considerate artefacte inacceptabile imaginile de polarizare („streaming", „Alkoholflucht", „images de fuite") observate mai ales în ficat, epitelii și mușchi după fixarea cu alcooli. Sînt artefacte de asemenea aglomerările glicogenului sub formă de flocoane mari, cauzate mai ales de fixatorii cu acid acetic. Prezența glicogenului în lumenul vaselor este consecința unor deplasări mari extracelulare, cauzate de tehnică.

Fixarea altor polizaharide decît glicogenul cu fixatori topografici uzuali nu corespunde în toate cazurile, căci unele heterozide pot fi dizolvate sau sînt

Scanned with OKEN Scanner

defavorizate anumite reacţii de evidenţiere (metacromazia, PAS etc.).

Fixarea cu formol 10% neutralizat, utilizat la rece şi o durată nu prea îndelungată (4—12 ore) poate fi satisfăcătoare pentru mucinele conjunctive şi epiteliale, unele glucide complexe, mucopolizaharide (M.P.Z.) şi mucoproteine. Fixarea se ameliorează dacă se utilizează formolul în diferite combinaţii: alcool-formol, formol cu 2% acetat de sodiu, formol cu 8% clorură de cetilpiridină sau formol saturat cu hidroxid de bariu (pentru mastocite).

Majoritatea autorilor consideră însă amestecul Bouin ca fiind superior formolului.

Alcoolul etilic conservă satisfăcător MPZ şi chiar polizaharidele labile. Nu conservă însă hormonii mucoproteici antehipofizari. Se utilizează la 0—4°C) alcool absolut simplu sau în combinaţii: alcool-formol, alcool-formol-ac. acetic sau alcool saturat cu ac. picric 85 ml, formol conc. 10 ml şi ac. acetic 5 ml. Amestecul Carnoy fixează bine MPZ acide şi mastocitele, dar nu este potrivit pentru studiul metacromaziei.

Fixarea cea mai bună a MPZ acide se realizează cu amestecuri pe bază de săruri de plumb, care permit apoi şi colorаţii metacromatice. Se utilizează o sol. 4% subacetat de plumb, simplă sau în părţi egale cu formol 10%. Acetatul de plumb sol. 1—8% se utilizează la fel şi cu rezultate similare. Precipitatul ce rămîne în secţiuni se elimină prin spălare cu HCl sol. 0,1 N.

Amestecurile pe bază de sublimat, crom şi ac. osmic nu se recomandă (cu excepţia fixării hormonilor mucoproteici hipofizari cu formol-sublimat).

O fixare excelentă a MPZ acide, acid hialuronic şi chiar a MPZ labile din maladia lui Hurler se

Scanned with OKEN Scanner

realizează cu clorură de cetilpiridină, care formează cu substanţele amintite complexe insolubile (vezi pag. 28). Fixarea cu acest agent nu se face la rece (precipită). Rezultate asemănătoare în cazul polizaharidelor uşor solubile se obţin şi prin fixare 24—34 de ore în dioxan, iar înainte de colorare secţiunile se refixează cu un amestec de formol-clorură de cetilpiridină.

Tetrahidrofuranul în părţi egale cu acetona se utilizează pentru fixarea secţiunilor obţinute prin congelare.

Prelucrarea probelor prin congelare-deshidratare dă rezultate superioare celor obţinute prin tehnicile de mai sus, dacă este urmată de fixare cu vapori de formaldehidă şi includere în Carbowax sau parafină. Metoda de congelare-substituţie dă rezultate similare.

Reacţiile de evidenţiere ale glucidelor nu identifică decît rareori entităţi chimice bine definite ci ele caracterizează radicalii sau funcţiile chimice (grupe glicol, carboxil, sulfat etc.) care pot aparţine unor tipuri de glucide diferite sau chiar unor substanţe de altă natură. Vom grupa tehnicile astfel: 1. reacţii pentru grupe (glicol, carboxil); 2. reacţii combinate; 3. reacţii pentru varietăţi de glucide.

B. REACŢII PENTRU GRUPĂRI GLICOL

1. REACŢIA PAS-HOTCKISS-McMANUS ŞI REACŢIILE ECHIVALENTE

Reacţia PAS (Periodic-Acid-Schiff) şi reacţiile similare decurg în trei faze: într-o primă fază are loc oxidarea glicolilor cu acid periodic (sau alţi

Scanned with OKEN Scanner

agenţi oxidanţi) fapt ce face să apară aldehide; acestea, în a doua fază a reacţiei, sînt vizualizate cu ajutorul reactivului Schiff; a treia fază constă dintr-un ansamblu de procedee de control prin care se verifică dacă reacţia de vizualizare a evidenţiat într-adevăr aldehidele formate prin oxidarea din prima fază, dacă aldehidele provin din oxidarea unor glucide, natura acestor glucide sau grupul de glucide din care fac parte.

Desfăşurată într-un mediu acid (pH aprox. 2), oxidarea periodică duce la formarea a doi carbonili primari, pornind de la funcţiile 1,2-glicol, 1-2-amino-alcool, 1,2-alkilamino-alcool, 1,2-hidroxi-cetonică; desfacerea lanţului de carboni se face între cei doi atomi de carbon care sînt purtătorii grupărilor oxidate şi astfel ciclurile piran sau furan ale polizaharidelor sînt deschise, dar scheletul macromolecular se păstrează nealterat. În condiţiile prescrise de tehnică, oxidarea se opreşte la stadiul de aldehidă. Modul în care reactivul Schiff vizualizează aceste grupări s-a arătat la pag. 119. În cazul glucidelor, reacţia de culoare poate avea loc numai atunci cînd aldehidele se formează în număr suficient de mare şi dacă acestea nu difuzează şi rămîn ataşate de molecule.

Formarea de carbonili primari prin oxidare cu acid periodic nu este o exclusivitate a glucidelor, ci există numeroase alte substanţe care pot fi modificate, tot aşa cum există unele polizaharide care nu sînt PAS-pozitive. Acest fapt reduce mult specificitatea reacţiei şi justifică necesitatea metodelor complementare de control. În tabelul 9 sînt prezentate substanţele evidenţiabile prin reacţia PAS. Firesţe că nu vor fi prezente într-un ţesut oarecare toate aceste substanţe şi că deci, specificitatea efec-

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 9

Substanţe evidenţiabile prin reacţia PAS
(după H a l e)

Polizaharide	Glicogen, galactogen, amidon, celuloză tunicină, dextran
M.P.Z. neutre	Chitină, mucus gastric
M.P.Z. acide	Mucine, acid hialuronic (?), heparina (formele puţin sulfatate
Mucoproteine	Tireoglobulină, hormonul tireotrop, gonadostimulinele, mucoizii glandei submaxilare, polizaharidele din capsula cristalinului
Glicoproteine	Gelatina, Ovalbumina, serumalbumina, colagenul, reticulina
Glicolipide şi lipide	Cerebrozidele, sfingomielina, cardiolipina, cefalina, pigmentul ceroid, lipofuscinele
Substanţe diverse	Adrenalina, noradrenalina, corticosteronul, dehidrocorticosteronul, acidul ascorbic

tivă (sau actuală) este mult mai bună decît cea teoretică. În realitate, dacă se îndepărtează glicogenul prin digestie enzimatică şi dacă se extrag lipidele cu solvenţi adecvaţi, substanţele care reacţionează PAS-pozitiv sînt MPZ neutre, libere sau legate de proteine.

Practica reacţiei PAS. **Reactivi:** 1. sol. apoasă 0,5—0,8% ac. periodic; 2. reactiv Schiff (pag. 120), 3. apă sulfuroasă proaspăt preparată (pag. 121). **Tehnica:** 1. metoda se poate aplica după fixări variate (pag. 266) sau tratament prin congelare-deshidratare, congelare-substituţie, pe secţiuni din probe incluse în parafină, Carbowax etc. sau secţionate prin congelare şi postfixate; 2. secţiuni deparafinate, co-

Scanned with OKEN Scanner

lodinate şi hidratate (debarasate de precipitatele de mercur sau de plumb cînd este cazul) se oxidează timp de 5—10 min. cu sol. 1 la temp. laboratorului; 3. spălare cu apă curentă 5—10 min.; 4. tratare cu reactiv Schiff în vas acoperit şi la temp. laboratorului timp de 15 min.; 5. spălare în trei băi cu sol. 3, cîte 2 min. în fiecare; 6. spălare 5 min. cu apă curentă în decursul căreia coloraţia se intensifică evident; 7. asocierea facultativă cu o coloraţie complementară (vezi în continuare) urmată de diferenţiere şi spălare cu apă; 8. deshidratare cu alcool, clarificare cu xilol, montare în balsam sau medii sintetice. **Rezultat:** substanţele PAS-pozitive (tabelul 9) se colorează în roşu-violet. **Observaţii:** sol. de ac. periodic se conservă bine, dar vom avea în vedere gradul ei de epuizare, aşa că nu vom prelucra în 100 ml sol. mai mult de 70 lame.

Pentru evidenţierea substanţelor PAS-pozitive hidrosolubile (dextran) sol. oxidantă se prepară astfel: ac. periodic 0,4 g; alcool etilic 90° 35 ml; acetat de sodiu 0,2 M 5 ml; durata oxidării în acest caz este de 2 ore; etalarea secţiunilor nu se face cu apă ci cu alcool 90°, iar după deparafinare nu se mai hidratează, ci din alcool 96°. se trec direct la oxidare.

McManus şi Mowry au observat că în unele cazuri sol. 0,5% ac. periodic în ac. acetic produce o coloraţie mai puternică decît sol. apoasă.

În lipsa ac. periodic cristalizat, acesta poate fi preparat extemporan în stare născîndă, amestecînd 0,5 ml ac. azotic 70% cu 1 g periodat de sodiu şi completînd sol. cu 100 ml apă, sau dizolvînd 1 g periodat de sodiu sau de potasiu în 100 ml SO_4H_2 1 N.

Reacţia PAS se pretează la asocierea cu numeroase tehnici histologice: coloraţie nucleară (sînt de

Scanned with OKEN Scanner

preferat lacurile ferice progresive de hematoxilină, ca hematoxilina Groat sau Weigert), precedarea reacţiei de către impregnaţia argentică a fibrelor de reticulină (de preferat metoda Gordon-Sweet căci nu impregnează nucleii) sau de colorare a fibrelor elastice (metoda Weigert urmată de o completă decolorare a fondului cu alcool acidulat cu 1—2 pic. de HCl conc.; pentru asocierea reacţiei PAS cu colorații mai complexe ca: PAS-hematoxilină-indigocarmin, PAS-hematoxilină-orange G, alocrom Lillie, PAS-fuxina-paraldehidă etc.) (vezi de aceiași autori „Tehnici de histologie normală și patologică", Ed. CERES, 1974). Toate aceste colorații combinate, utile mai ales în morfopatologie căci evidenţiază unele modificări ale vaselor și substanţei conjunctive fundamentale, atenuează într-o oarecare măsură intensitatea reacţiei PAS.

După M. Gabe, spălarea cu apă sulfuroasă nu este necesară decît în cazul în care reacţia se aplică pe secţiuni la congelare. În cazul secţiunilor la parafină, evitarea apariţiei unei reacţii fals pozitive, prin oxidare atmosferică a fucsinei decolorate, se poate face foarte bine prin simpla spălare cu apă curgătoare timp de 10 min.; după Lison, Barka și Anderson, spălarea cu apă sulfuroasă se va face întotdeauna cînd reacţia PAS se utilizează în scopuri de cercetare.

VARIANTE ALE REACŢIEI PAS

Variante cu alţi agenţi oxidanţi. Oxidările cu acid cromic, permanganat de potasiu, trioxid de crom ș.a. nu sînt recomandate, deoarece nu sînt bazate pe date chimice sigure și nu este sigur că oxidarea se oprește la stadiul de aldehidă. Dimpotrivă,

Scanned with OKEN Scanner

oxidarea cu bismutat de sodiu se pare că are o mai mare specificitate pentru glucide și nu prezintă riscul depășirii stadiului de aldehidă. **Procedeul recomandat de Lhotka** este următorul: 1. secțiuni deparafinate, colodinate și hidratate se oxidează 3 min. cu amestecul: acid ortofosforic 80 ml, apă dist. 20 ml, bismutat de sodiu 1 g; se prepară extemporan; 2. spălare cu apă 1—2 min.; 3. spălare 15 sec. cu HCl N apoi cu apă dist.; 4. reactiv Schiff 10 min. ș.a.m.d.

Oxidarea cu tetraacetat de plumb dă rezultate comparabile cu cea cu acid periodic, cu deosebire că fondul preparatelor este mai clar, deoarece dintre aminoacizi nu este oxidată decît hidroxilizina. Durata de oxidare nu are un interval de siguranță atît de mare ca în cazul acidului periodic.

În **varianta lui Graumann** se procedează astfel: 1. secțiuni deparafinate, colodinate, hidratate se spală 2×2 min. cu alcool absolut apoi 2×2 min., cu HCl-N; 2. oxidarea 15 min. cu sol.: tetraacetat de plumb 0,5 g, acid acetic 8N (ac. acetic glacial 50 ml, apă dist. 50 ml) 100 ml; se prepară extemporan și nu se reutilizează; 3. clătire rapidă cu sol. acid acetic 8N; spălare 15 min. cu apă curentă, clătire cu apă dist.; reactiv Schiff 20 min. ș.a.m.d.

VARIANTE CU ALȚI AGENȚI DE VIZUALIZARE DECÎT REACTIVUL SCHIFF. Evidențierea substanțelor modificate prin oxidare este posibilă și cu agenți ca: hidrazine, p-fenilendiamină, m-aminofenol și complexe alcaline de argint. Unele din aceste variante (metoda Gömöri sau Monné-Slantterback) nu sînt mai sensibile sau mai specifice decît reacția PAS, dar au avantajul unui contrast optic mai pronunțat. Alte variante ca cea

Scanned with OKEN Scanner

a lui Scarselli, Spicer sau Lillie-Gillmar Welsh sînt mai sensibile și mai specifice decît reacția PAS, ba chiar permit și diferențierea unor categorii de glucide.

a) **Metoda Gömöri** cu argint-hexametilentetramină. **Principiu:** grupările reactive sînt oxidate cu acid cromic sau periodic, iar aldehidele eliberate se evidențiază reducînd complexul de argint-hemametilentetramină. **Reactivi:** 1. sol. apoasă 5% de trioxid de crom, preparată extemporan sau sol. 0,5% acid periodic; 2. sol. mamă de argint hexametilentetramină 25 ml. (pag. 104), 25 ml, apă dist., 5 ml tampon Holmes cu pH 8,8 (sol. apoasă 1,23% de acid boric 30 ml, sol. apoasă 1,9% de tetraborat de sodiu 70 ml); 3. sol. apoasă 0,2% clorură de aur; 4. sol. apoasă 5% tiosulfat de sodiu. **Tehnica:** 1. secțiuni deparafinate colodinate subțire și hidratate se oxidează 40—60 min. (se determină timpul optim prin tatonare) cu trioxid de crom sau 5—10 min. cu acid periodic; 2. spălare 5 min. cu apă curentă, apoi clătire cu apă dist.; 3. impregnare la 37°C cu sol. 2 preparată extemporan, timp de 30—60 min.; se vor controla preparatele tot la 15 min. și se va opri reacția atunci cînd structurile reactive se detașează net, de culoare brună-neagră pe fondul galben clar; 4. clătire cu apă dist.; 5. virare 5—10 min. cu sol. 3; 6. clătire cu apă dist. apoi fixare 2—5 min. cu sol. 4; 7. spălare 5 min. cu apă curentă, apoi deshidratare cu alcool, clarificare cu xilol, montare în balsam. **Rezultat:** structurile reactive (vezi tabelul 9) se impregnează în brun-negru. **Observații:** dacă după impregnare preparatele apar prea întunecoase, fondul se poate clarifica tratînd secțiunile colorate cu o sol. formată din 0,2 g sulfat feric, 0,5 g acid sulfuric și 100 ml apă distilată.

Scanned with OKEN Scanner

b) **Metoda Monnè-Slantterback. Principiu:** se utilizează succesiv doi agenţi de vizualizare ai aldehidelor pentru a decela carbonilii formaţi prin oxidare periodică. **Reactivi:** 1. sol. apoasă 0,5—0,8% acid periodic; 2. 100 ml alcool 30° în care se dizolvă la saturaţie 2,4-dinitrofenilhidrazină şi apoi se aduce la neutralitate cu sol. 0,2 N de NaOH; 3. reactiv Schiff (pag. 119). **Tehnica:** 1. secţiuni deparafinate, colodinate, hidratate se oxidează 5—10 min. cu sol. 1; 2. spălare 2×5 min. cu apă curentă, apoi cu apă dist.; 3. clătire cu alcool 70°; 4. tratare 12—24 ore cu sol. 2; 5. spălare repetată cu alcool 17°, apoi cu apă dist.; 6. tratare 30—45 min. cu reactivul Schiff; 7. spălare repetată cu apă dist., apoi 10 min. cu apă curentă; 8. deshidratare, clarificare, montare în mediu sintetic. **Rezultat:** structurile ce conţin glucide oxidabile cu ac. periodic se colorează în galben, iar celelalte în roşu.

c) **Metoda Scarselli cu p-fenilendiamină. Principiu:** aldehidele formate prin oxidare periodică măresc mult viteza de oxidare a p-fenilendiaminei în prezenţa apei oxigenate, fapt ce determină depunerea unui precipitat negru pe structurile bogate în grupe aldehidă libere. **Tehnica:** 1. secţiuni deparafinate şi hidratate se oxidează 5 min. cu sol. 0,5% ac. periodic; 2. spălare repetată cu apă dist.; 3. tratare la întuneric, timp de 15 min. cu un amestec în părţi egale de sol. apoasă 1% p-fenilendiamină (preparată cu apă dist., fiartă şi răcită) şi apă oxigenată 1,5%; soluţia se prepară extemporan; 4. spălare repetată cu apă dist. apoi virare cu o sol. 1% clorură de aur timp de 5 min.; 5. spălare cu apă dist., deshidratare, clarificare, montare în balsam. **Rezultat:** aldehidele formate prin oxidare periodică

Scanned with OKEN Scanner

se colorează în albastru violet, mai selectiv decît în reacţia PAS.

d) **Metoda Spicer-Jarreles cu N,N-dimetil p-fenilendiamină. Principiu:** reactivul formează cu aldehidele rezultate prin oxidarea periodică, produşi de condensare de culoare brună-galbenă; el formează de asemenea, dar mult mai lent, un produs de culoare neagră cu MPZ acide. **Reactivi:** 1. sol. apoasă 1% acid periodic; 2. sol. 0,1 M de acid citric 9,6 ml. sol. 0,2 M fosfat disodic 14,4 ml, apă dist. 76 ml clorhidrat de N.N-dimetil p-fenil-endiamină 0,1 g; sol. trebuie să aibă pH 5,9. **Tehnica:** 1. secţiuni deparafinate şi hidratate se oxidează 10 min. cu sol. 1; 2. clătire cu apă, apoi, incubare 3—72 ore în sol. 2 (lamele incubate mai puţin de 8 ore se usucă la aer 10 min., iar cele tratate peste 8 ore se diferenţiază 8—10 sec. cu alcool 70° acidulat cu cîteva picături de HCl 0,1 N; 3. spălare cu apă dist. 2—5 min., deshidratare, clarificare, montare în mediu sintetic. **Rezultat:** grupele aldehidă ale MPZ neutre se colorează în brun-oranj (foarte fluorescent în ultraviolet), MPZ acide în negru.

e) **Metoda Lillie-Gillmer-Welsh cu m-aminofenol. Principiu:** aldehidele eliberate prin oxidare periodică formează cu reactivul un produs de condensare, care ulterior este cuplat cu o sare de diazonium cu care formează un colorant azoic negru. **Reactivi:** 1. sol. 1% acid periodic; 2. sol. 11% m- aminofenol în ac. acetic glacial; 3. sol. din 3 mg Fast Black-K salt în 1 ml tampon veronal-HCl 0,1 N cu pH 8,0. **Tehnica:** 1. fixarea optimă este cu formol neutralizat sau formol Baker, includere în parafină; 2. secţiuni deparafinate şi hidratate se oxidează 10 min. cu sol. 1; 3. spălare 10 min. cu

Scanned with OKEN Scanner

apă curentă; 4. tratare 1 min. cu ac. acetic glacial; 5. tratare 1 oră cu sol. 2; 6. spălare 10 min. cu apă curentă apoi clătire cu apă dist.; 7. tratare 2 min. la +3°C cu sol. 3; 8. spălare 3×5 min. cu HCl sol. 0,1 N, apoi spălare 10 min. cu apă dist.; 9. deshidratare, clarificare, montare în mediu sintetic. **Rezultat:** structurile ce conţin grupări oxidabile cu acid periodic se colorează în negru.

2. PROCEDEE DE CONTROL ALE REACŢIEI PAS (ŞI VARIANTE)

Este vorba de un ansamblu de reacţii care în final duc la creşterea specificităţii reacţiei PAS. C. Velican, Doina Velican şi N. Carp, autori cu o experienţă unanim recunoscută în domeniul histochimiei mucopolizaharidelor, recomandă următoarea suită de operaţii:

1. Extragerea lipidelor persistente şi după includere în parafină prin tratarea secţiunilor, la 56°C timp de 24 ore, cu cloroformpiridină, cloroform, eter, alcool metilic, urmată de colorare cu Sudan BB pentru evidenţierea grăsimilor neutre, fosfolipidelor şi glicolipidelor. Dacă aceste substanţe sînt neextractibile cu solvenţii amintiţi, prezenţa lor va fi indicată de o coloraţie neagră. În acest caz, diferenţierea faţă de substraturile glucidice se face prin compararea a două secţiuni vecine. Dacă substanţele PAS-pozitive şi cele sudanofile au o localizare identică, înseamnă că reacţia a evidenţiat complexe glucido-lipido-protidice, iar dacă localizarea este diferită, înseamnă că reacţia PAS a evidenţiat numai mucopolizaharidele neutre.

Scanned with OKEN Scanner

2. Îndepărtarea glicogenului prin digestie cu amilază.

3. Blocarea reactivității proteinelor prin procedeul de **acetilare reversibilă** a lui McManus și Carson. În condițiile de tehnică prescrise de acești autori, amestecul de anhidridă acetică și piridină face ca grupările 1,2-glicol să devină areactive, iar saponificarea cu hidroxid de potasiu le restabilește reactivitatea față de PAS. Acetilarea abolește și reactivitatea grupelor amino-alcool libere ale proteinelor, dar aceasta nu mai este restabilită prin saponificare. În felul acesta se poate face o diferențiere între substraturile glucidice și protidice PAS-reactive. **Acetilarea** se realizează cu un amestec de anhidridă acetică și piridină în proporție de 4 : 6. Durata de acțiune este în general de 24 ore la temp. laboratorului și de 5 ore la 56°C. O sol. 10% anhidridă acetică în piridină anhidră realizează acetilarea, la temp. laboratorului în aprox. o oră. Amestecul pentru acetilare nu se reutilizează. **Saponificarea** preparatelor acetilate și spălate din abundență se face cu o sol. N/10 de KOH în alcool 70°, timp de 45—60 min. tot la temp. laboratorului. Saponificarea se mai poate realiza și cu o sol. amoniac 20% în alcool 70°. În cursul saponificării există riscul dezlipirii secțiunilor, accident ce poate fi prevenit prin colodinare. Aceste două tratamente succesive se încheie cu efectuarea reacției PAS (pag. 270). Pentru lucrările de rutină se poate aplica procedeul de acetilare reversibilă propus de Lillie: 1. se deparafinează, colodinează și hidratează trei secțiuni învecinate, notate cu A, B, C; 2. secțiunea A se lasă în așteptare pînă la punctul 7; 3. secțiunea B și C se supun acetilării; 4. se spală secțiunile B și C cu apă; 5. saponificarea secțiunilor B și C; 6. spălare

cu apă; 7. efectuarea reacţiei PAS pe secţiunile A. B şi C. **Rezultat:** dacă structurile colorate în preparatul A sînt de natură glucidică, atunci reacţia în preparatul B trebuie să fie negativă, iar în preparatul C ca şi în A, căci saponificarea a restabilit reactivitatea grupelor 1-2-glicol.

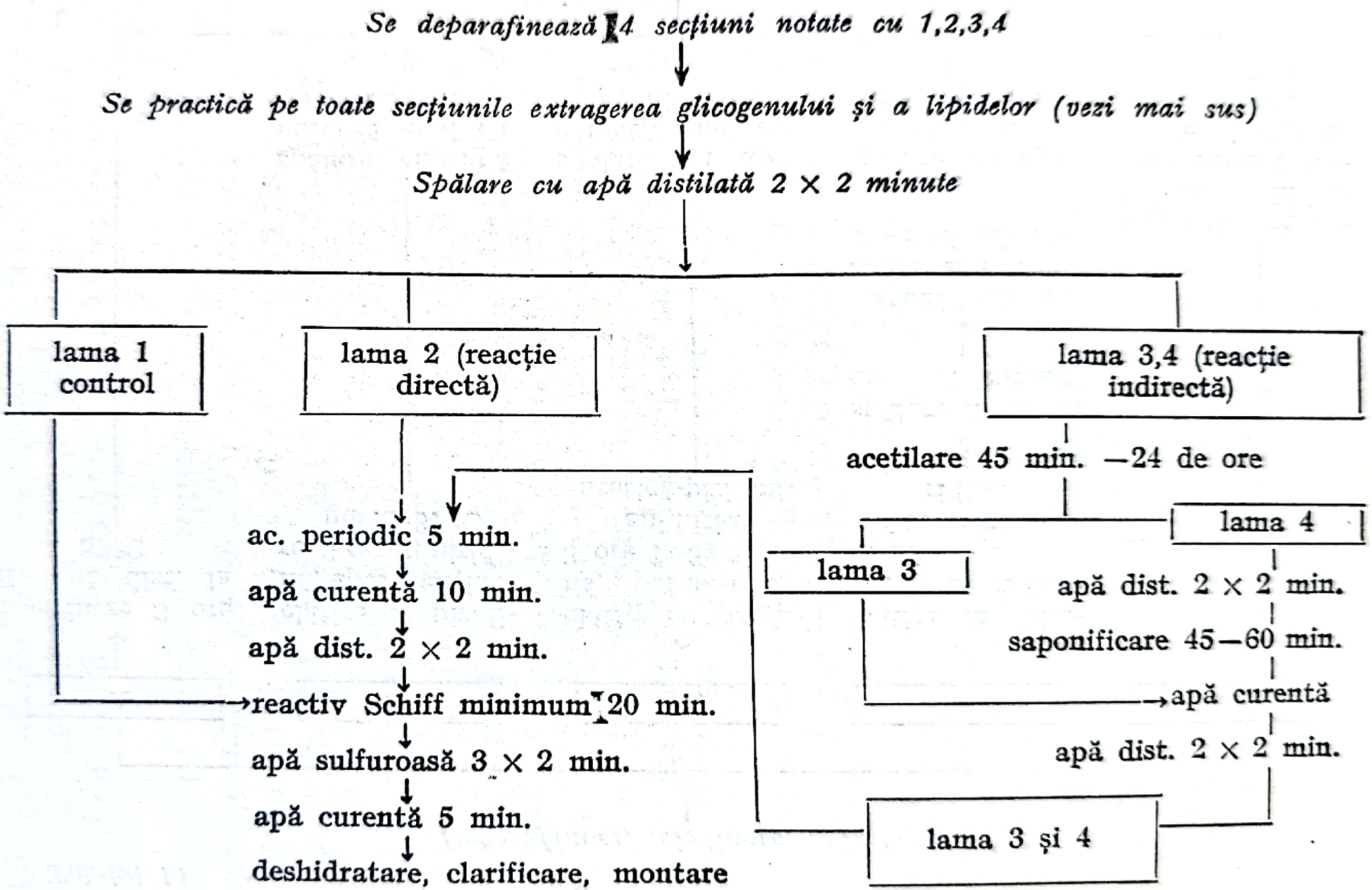
Dacă în preparatul C pozitivitatea structurilor din preparatul A nu se restabileşte, atunci reacţia din preparatul A este dată de substanţe protidice, prin oxidarea grupelor aminoalcool.

Un procedeu mai complex este cel prezentat în tabelul 10. Dacă în lamele 2 şi 4 reacţia PAS este pozitivă, iar în 1 şi 3 negativă, se poate conchide cu suficientă siguranţă că substratul reactiv este reprezentat de glucide (sau de componenta glucidică a complexelor glucido-protidice).

G a b e şi M a r t o j a interpretează puţin diferit rezultatul acetilării reversibile, deoarece admit că reactivitatea unor grupări ca alfa-cetol şi 1-hidroxi-2-alchilamino nu este abolită prin acetilare şi că saponificarea restabileşte totuşi, într-o mică măsură, posibilitatea ca grupele aminoalcool să fie oxidate cu acid periodic şi să reacţioneze slab cu reactivul Schiff. Astfel considerînd faptele, înseamnă că diminuarea evidentă a intensităţii reacţiei PAS pe secţiunile acetilate şi saponificate este un indiciu al prezenţei în structurile cercetate a altor grupări reactive decît grupările 1,2-glicol. După aceiaşi autori, acetilarea reversibilă permite şi identificarea lipidelor PAS-pozitive care au rezistat includerii în parafină, deoarece amestecul de anhidridă acetică — piridină realizează şi extracţia lipidelor. Procedeul recomandat de G a b e şi M a r t o j a se practică astfel: (tabelul 11).

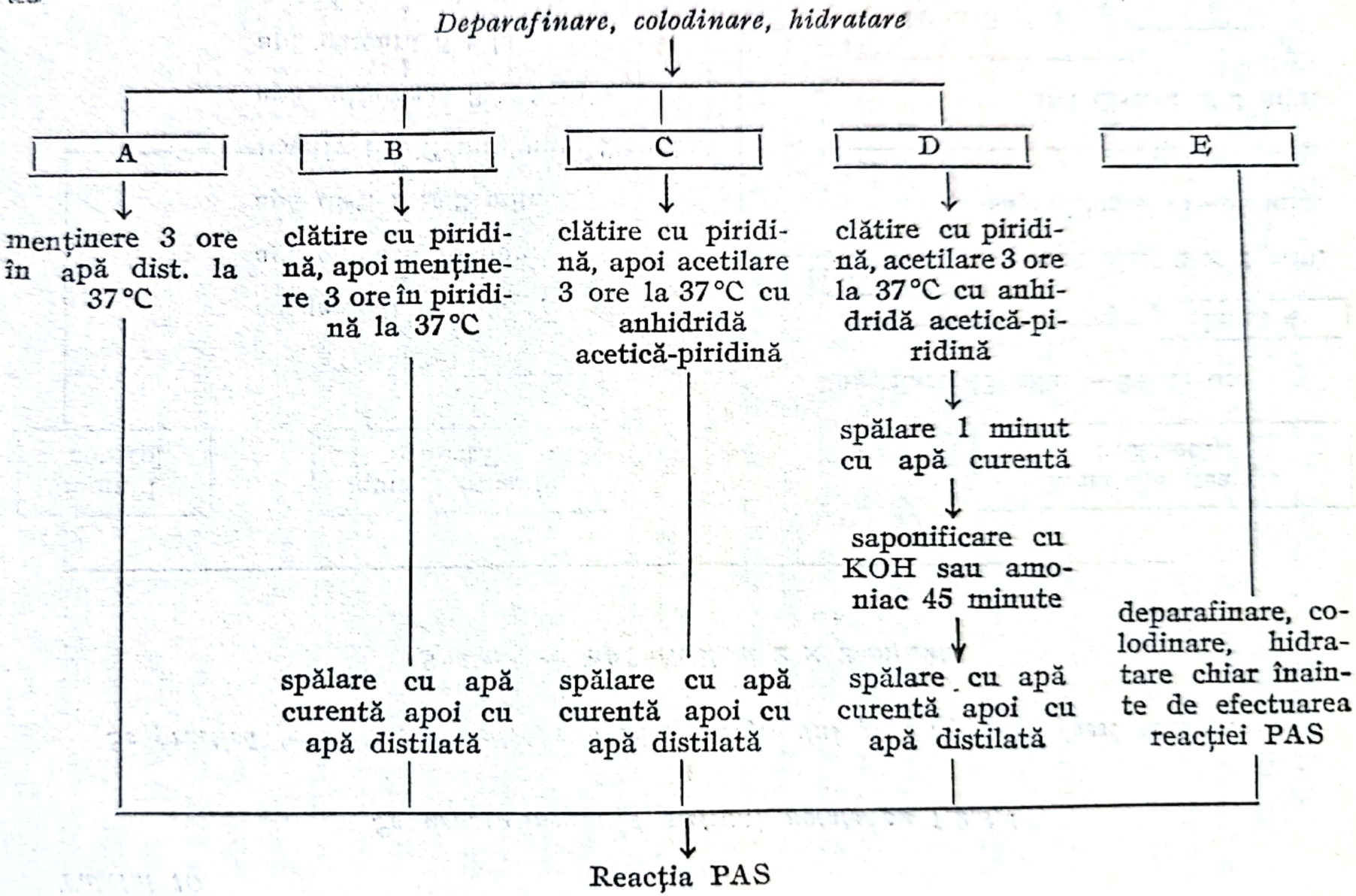
Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 10



Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 11



Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 12

Substanţele evidenţiate	A	B	C	D	E
Glucide bine insolubilizate prin fixare	+	+	−	+	+
Glucide slab insolubilizate prin fixare	−	− sau +	−	− sau +	+
Lipide	+	−	−	−	+
Protide	+	+	−	±	+

Rezultat: se interpretează ţinînd seama de intensităţile reacţiilor în cele 5 preparate (A—E) (tabelul 12).

Prin toate aceste operaţii, stabilim în final natura glucidică neglicogenică a materialului PAS-pozitiv. În continuare, pentru a putea stabili cu mai multă precizie că reacţia a evidenţiat MPZ neutre, Velican şi col. recomandă următoarele reacţii:

a) **Excluderea MPZ acide** prin extracţie enzimatică (pag. 303).

b) **Provocarea metacromaziei** prin tratare cu acid sulfuric conc. (pag. 300).

c) **Eliminarea totală sau parţială a materialului PAS-pozitiv** prin hidroliză acidă moderată sau digestie cu neuramidază (pag. 306), sau enzime proteolitice (pepsină, tripsină) (pag. 159).

d) **Constatarea prezenţei proteinelor,** prin reacţii pentru tirozină, triptofan, histidină etc. (pag. 144) în zonele în care reacţia PAS a

Scanned with OKEN Scanner

evidenţiat componenta glucidică a complexelor glucido-proteice.

e) **Utilizarea unor coloraţii combinate** pentru evidenţierea simultană a MPZ acide şi neutre (pag. 308).

CONTROLUL REACŢIEI PAS PRIN BLOCAJUL ALDEHIDELOR

Aldehidele formate în urma oxidării cu ac. periodic, în cazul reacţiei PAS, pot fi blocate prin una dintre metodele expuse la pag. 124. Reacţia de blocaj se intercalează între spălarea ce urmează oxidării cu ac. periodic şi tratamentul cu reactiv Schiff. Zonele care pe preparatul martor au reacţionat pozitiv nu se mai colorează pe preparatul de control.

C. REACŢII PENTRU GRUPELE ACIDE

Grupele acide ale heterozidelor se evidenţiază mai ales datorită afinităţii lor faţă de coloranţii cu caracter bazic, prin cercetarea bazofiliei la pH-uri diferite sau prin studiul metacromaziei. Ca în cazul evidenţierii grupării 1,2-glicol şi în acest caz este necesară creşterea specificităţii reacţiilor prin metode de blocaj, extracţie prin digestie enzimatică sau acidă etc.

1. METODE BAZATE PE UTILIZAREA COLORANŢILOR BAZICI

Această categorie de metode se bazează pe coloraţii cu ftalocianine din grupul alcian, reacţii cu fier coloidal sau cu paraldehidă-fucsină.

Scanned with OKEN Scanner

Coloraţiile cu ftalocianine din grupul albastrului alcian. Albastrul alcian împreună cu verdele alcian, galben alcian şi albastrul astra sînt coloranţi din grupa ftalocianinelor cuprice. Formula lor chimică nu este încă precis stabilită, dar utilizaţi în tehnica histologică ei se comportă la fel cu coloranţii bazici, exceptînd faptul că sînt lipsiţi de afinitate faţă de nucleoproteine. Mecanismul intim al reacţiei nu este bine precizat. Rezultatul coloraţiei este în mod esenţial determinat de pH-ul soluţiei colorante. La un pH 2,4—2,6 se colorează mai ales acizii uronici nesulfataţi şi anumiţi polimeri sulfataţi, în timp ce la un pH de aproximativ 1,0 colorantul reacţionează numai cu grupările sulfatate. În toate cazurile, coloraţia este favorizată de fixările cu Carnoy, formol Baker şi defavorizată de fixatorii pe bază de acid picric.

Metoda Wagner-Shapiro cu albastru alcian: 1. secţiuni deparafinate, colodinate şi hidratate se colorează timp de 20 min. cu o sol. 0,1% albastru alcian 8 GX în sol. 3% ac. acetic glacial (pH 2,4—2,6); 2. clătire rapidă în trei băi de acid acetic 1—2% apoi cu apă dist., 3. coloraţie nucleară cu Kernechtrot (facultativ), deshidratare, clarificare, montare.

Metoda Zugibe cu albastru alcian: 1. deparafinare, colodinare, hidratare, colorare 10 min. cu o sol. 0,1% albastru alcian 8 GX în HCl sol. 0,01 (pH 2,2); 2. clătire rapidă cu apă dist.; apoi cu HCl 0,01 N şi din nou cu apă distilată; 3. colorare nucleară cu Kernechtrot (facultativ), deshidratare, clarificare, montare. **Rezultat:** prin ambele tehnici se evidenţiază, printr-o coloraţie albastră, structurile bogate în mucosubstanţe sulfatate salb acide, acizii hialuronici şi sialomucinele.

Scanned with OKEN Scanner

Metoda Spicer cu albastrul alcian la pH 1,5: 1. secțiuni deparafinate, colodinate și hidratate se colorează 30 min. cu o sol. 0,5% albastru alcian 8 GX într-o sol. tampon cu pH 1,5; 2. sugativare cu hîrtie de filtru, deshidratare cu alcool absolut, clarificare cu xilol, montare.

Metoda Lev-S Picer cu albastru alcian la pH 1,0: ca mai sus, doar că se utilizează o sol. 1% albastru alcian 8 GX în HCl 0,5 N (pH 0,5) sau 0,1 N (pH 1,0). **Rezultat:** prin ambele metode se colorează în albastru numai mucosubstanțele sulfatate. **Observații:** se pare că dizolvarea colorantului cu sol. HCl face soluțiile mai stabile și colorațiile mai specifice decît în cazul dizolvării cu ac. acetic.

Metoda Putt-Hukill cu verde alcian: 1. se utilizează o sol. 1% verde alcian în acid acetic 2% timp de 10—15 min. **Rezultat:** ca în metoda Wagner și Zugibe; autorii afirmă că verdele alcian dă colorații mai contraste și că este mai sensibil decît albastru alcian.

Metoda Pioch cu albastru astra: 1. colorare 5—10 min. cu o sol. 1% albastru astra în acid acetic 1%; 2. clătire cu acid acetic 1%, apoi cu apă dist.; 3. colorare nucleară facultativă, deshidratare, clarificare, montare. **Rezultat:** același ca în cazul albastrului alcian, doar că intensitatea colorației este mai mare.

Metoda Ravett cu albastru alcian și galben alcian: 1. secțiuni deparafinate, colodinate și hidratate se colorează 30 min. în sol. 0,5% albastru alcian 8 GX în tampon citrat de sodiu — HCl cu pH 0,5; 2. clătire cu tampon pH 0,5 timp de 10 sec.; 3. spălare 2 min. cu apă dist. schimbată de cîteva ori; 4. colorare timp de 30 sec. cu sol. 0,5% galben alcian în tampon citrat de sodiu-HCl pH 2,5; 5. clă-

Scanned with OKEN Scanner

tire rapidă cu tampon pH 2,5; 6. clătire cu apă dist.; 7. colorare nucleară cu Kernechtrot; 8. spălare 1—2 min. cu apă curentă, deshidratare cu alcool absolut, clarificare cu xilol, montare. **Rezultat:** mucosubstanţele puternic acide (sulfomucopolizaharidele) se colorează în albastru, iar mucosubstanţele slab acide (cu grupări carboxil) se colorează în galben; structurile unde aceste substraturi coexistă se colorează în verde. **Observaţii:** după punctul 6 se poate continua cu reacţia PAS pentru mucopolizaharide neutre.

2. METODE BAZATE PE FIXAREA IONILOR METALICI

Aceste metode se bazează pe faptul că ionii ferici, dintr-o sol. coloidală de hidroxid de fier se fixează pe grupările electronegative ale MPZ acide (grupările sulfat şi carboxil); fierul fixat este ulterior evidenţiat prin reacţia albastrului de Prusia. Numeroasele variante existente nu sînt perfect echivalente în privinţa specificităţii. Deosebirile sînt cauzate de pH şi de modul de diluare a sol. de fier coloidal. Cu cît pH-ul sol. este mai coborît, cu atît creşte specificitatea reacţiei pentru grupările acide. Cu variantele în care acest deziderat nu este asigurat se evidenţiază alături de MPZ sulfatate şi anumite MPZ neutre, polinucleotide, fosfoproteine şi fosfolipide. Considerăm că metodele cele mai sensibile şi specifice, superioare în această privinţă chiar faţă de albastru alcian şi metacromazie sînt cele preconizate de Müller-Mowry şi Mowry în care pH-ul sol. este de aproximativ 1,6.

Metoda Müller-Mowry. **Reactivi:** 1. sol. mamă de hidroxid de fier coloidal se prepară adăugînd la 250 ml apă dist. clocotindă 4,4 ml sol. 29% clorură

ferică; este important ca apa să fiarbă în timp ce se adaugă clorura ferică și să fie menținută astfel în continuare pînă cînd soluția devine de culoare roșie-închis; se lasă să se răcească, după care se poate conserva cîteva luni; 2. sol. de lucru se prepară, chiar înainte de întrebuințare, amestecînd 5 ml ac. acetic glacial, 15 ml apă dist. și 20 ml sol. mamă; 3. se prepară extemporan un amestec în părți egale de sol. 2% HCl și sol. 2% ferocianură de potasiu. **Tehnica:** 1. secțiuni deparafinate, colodinate foarte subțire și hidratate se clătesc rapid cu o sol. 12% ac. acetic; 2. tratare timp de o oră cu sol. 2; 3. clătire 3×4 min. cu acid acetic glacial sol. 12%; 4. tratare cu sol. 3 timp de 20 min.; 5. spălare cu apă curgătoare 5 min.; 6. colorație nucleară (facultativ), deshidratare, clarificare, montare în rășină sintetică. **Rezultat:** anumite mucopolizaharide acide se colorează în albastru intens (alături de MPZ bogate în acizi uronici și acid sialic se colorează mai slab și unele MPZ neutre, precum și unele MPZ sulfatate ale țesutului conjunctiv).

Metoda Mowry. **Reactivi:** 1. se prepară sol mamă ca mai sus, apoi se trece într-un sac de celofan, umplut pe jumătate și se scufundă totul într-un recipient ce conține un volum de apă dist. de 5—10 ori mai mare decît sol. de hidroxid de fier coloidal; dializa durează 18—24 ore, timp în care se schimbă apa distilată de mai multe ori; după dializă sol. se filtrează și poate fi păstrată cîteva luni; 2. sol. de lucru se prepară amestecînd în momentul folosirii, 12 ml ac. acetic glacial, 18 ml apă dist. și 10 ml sol. mamă (dializată); 3. ca în tehnica precedentă. **Tehnica:** 1. secțiuni deparafinate, colodinate în strat subțire și hidratate se tratează 2 ore cu sol. 2; 2. spălare 3×10 min. cu ac. acetic sol. 30%; 3. spă-

Scanned with OKEN Scanner

lare 5 min. cu apă curentă, apoi cu apă dist.; 4. tratare 20 min. cu sol. 3; 5. spălare 5 min. cu apă curentă; 6. coloraţie nucleară (facultativ), deshidratare, clarificare, montare în mediu sintetic. **Rezultat:** această variantă este mai selectivă decît precedenta pentru MPZ acide. **Observaţii:** se vor efectua de fiecare dată şi lame de control, adică la care se omite tratarea cu hidroxid de fier coloidal; metoda se pretează bine la contracolorări (hemalaun, acid picric) sau reacţii histochimice (Feulgen sau PAS, vezi pag. 174, 269).

Metoda „bi-col" a lui Wolman. **Principiu:** se utilizează pe rînd o sol. de fier coloidal şi una de argint coloidal, fierul avînd o afinitate mare pentru grupările puternic acide ale MPZ-sulfatate, pe cînd argintul coloidal este fixat pe grupările slab acide ale MPZ nesulfatate. **Reactivi:** 1. se prepară sol. de hidroxid de fier coloidal ca pentru metoda Müller-Mowry (pag. 287). 2. sol. HCl-ferocianură ca în metoda precedentă; 3. sol. 0,2% clorură de aur 2,5 ml, apă dist. 90 ml; 4. formol conc. 10 ml, sol. 0,5% KOH 100 ml; 5. sol. de argint coloidal se prepară extemporan, amestecînd 2 ml din sol. 4 cu 90 ml din sol. 3; se agită puternic apoi se fierbe 15—30 min.; sol. trebuie să devină roşietică (nu violetă) şi să aibă pH 5. **Tehnica:** 1. probe fixate, de preferinţă în Carnoy şi incluse în parafină; 2. secţiuni deparafinate şi hidratate se tratează 10 min. cu sol. 1; 3. spălare repetată cu apă dist.; 4. tratare 10 min. cu sol. 2; 5. spălare cu apă dist.; 6. tratare cu sol. 5%, la 37°C timp de 12—24 ore; 7. clătire cu apă dist., deshidratare, clarificare, montare în balsam. **Rezultat:** grupele puternic acide ale MPZ sulfatate sau ale acizilor nucleici se colorează în albastru, grupele slab acide ale MPZ nesulfatate

Scanned with OKEN Scanner

se colorează în cafeniu-roșiatic închis. **Observații:** reușita este determinată mai ales de dimensiunea și încărcarea electrică a particulelor de argint coloidal. Modis și col. recomandă următorul mod de preparare: se amestecă 50 ml apă dist. cu 0,1 ml sol. 0,1 M acid ascorbic; se agită și se picură treptat 0,5 ml dintr-o sol. 1% clorură de aur; nu necesită fierbere.

3. COLORAREA CU PARALDEHIDĂ-FUCSINĂ (P.F.)

Mecanismul acestei metode, imaginate de Gömöri, nu este precizat, dar se cunosc bine structurile pe care amestecul de paraldehidă-fucsină bazică le evidențiază în mod specific. În general sînt P.F.-pozitive structurile care sînt metacromatice și (sau) PAS-pozitive. Metoda evidențiază deci structurile bogate în radical sulfat, cele care prin oxidare dobîndesc grupări acide, precum și cele bogate în MPZ neutre (tabelul 13).

În **procedeul original, Gömöri** recomandă prepararea colorantului astfel: se amestecă în ordine 100 ml alcool 60°, fucsină bazică 0,5 g, 1 ml paraldehidă purificată cristalizabilă și 1,5 ml ClH conc. Soluția se lasă 24—72 ore la temp. laboratorului, pînă cînd culoarea, inițial roșie, virează spre violet. Se păstrează la întuneric și rece, iar înainte de întrebuințare se aduce la temp. laboratorului. **Tehnica:** 1. secțiuni deparafinate și hidratate se oxidează cu sol. Lugol timp de 10—60 min.; se albesc cu sol. 5% tiosulfat de sodiu, se spală cu apă, apoi se colorează timp de 5—60 min. (în funcție de afinitatea structurilor de evidențiat); după

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 13

Principalele substanţe şi structuri colorabile cu paraldehidă-fucsină
(după Ganter şi Jolles)

1. Mucosubstanţe, glicoproteine, mucine	a) Mucine epiteliale sulfatate (puternic sau slab acide) sialomucine ; b) Substanţa fundamentală a cartilagiului, cordonului ombilical şi corneei corpul vitros ; c) Lichidul foliculilor ovarieni d) Produşii de neurosecreţie e) Coloidul tiroidian f) Mucosubstanţele sulfatate din tubii uriniferi
2. Elementele celulare din glandele endocrine	a) Anumite celule bazofile din adenohipofiză ; b) Celulele B din pancreasul endocrin
3. Granulaţiile unor celule	a) Mastocite ; b) Megacariocite ; c) Celulele principale ale glandelor gastrice fundice ; d) Celulele enterocromafine la anumite specii
4. Celule renale	a) Marginea „în perie" a nefrocitelor tubilor contorţi ; b) Mucosubstanţele sulfatate din tubii renali excretori şi colectori
5. Pigmentul lipofuscinic	
6. Keratina	
7. Acrozomii spermatozoizilor	
8. Fibrele elastice	

Scanned with OKEN Scanner

spălare repetată cu alcool 70° se pot aplica unele colorări de fond (facultativ) urmate de deshidratare, clarificare şi montare.

Varianta Gabe de preparare a colorantului şi de utilizare a fost prezentată la pag. 117. Aceste două moduri de utilizare nu dau rezultate echivalente. Varianta Gabe, dacă este aplicată fără preoxidarea secţiunilor, evidenţiază mai ales radicalii sulfat şi mai slab structurile bogate în grupări carboxil. Dimpotrivă, dacă se face preoxidarea secţiunilor timp de 1 min. cu un amestec în părţi egale din sol. 0,03% permanganat de potasiu şi sol. 0,03% acid sulfuric, reacţia se intensifică prin vizualizarea suplimentară a radicalilor acizi formaţi prin oxidare. Prin varianta Gabe se evidenţiază deci cu precădere MPZ-acide. Prin varianta Gömöri se obţin rezultate asemănătoare cu cele date de reacţia PAS, adică se evidenţiază mai ales MPZ-neutre.

4. REACŢIA METACROMATICĂ ÎN STUDIUL GLUCIDELOR

Mecanismul metacromaziei, precum şi unele modalităţi tehnice de aplicare ale reacţiei au fost prezentate la pag. 111. În histochimia glucidelor, metacromazia reprezintă o metodă pe cît de simplă pe atît de valoroasă, dar ea îşi dobîndeşte valoarea integrală numai dacă este asociată cu o serie de procedee menite să-i sporească specificitatea. Aplicată astfel, reacţia metacromatică ne permite să diferenţiem cu suficientă exactitate diferite categorii de glucide. Ca şi în cazul aplicării reacţiei metacromatice la studiul proteinelor, trebuie să avem în vedere influenţa decisivă pe care o au o serie de fac-

Scanned with OKEN Scanner

tori de ordin tehnic, ca: fixarea, acțiunea alcoolului asupra unor glucide metacromatice, concentrația și pH-ul soluției colorante, durata de colorare, post-tratamentul secțiunilor etc. Alți factori țin de natura substratului cercetat, precum și de influența unor substanțe neglucidice asupra reacției. Astfel, sărurile din țesuturi, precum și proteinele bazice au un efect competitiv asupra complexului colorant cromotrop. Substratul glucidic metacromatic determină intensitatea fenomenului prin concentrația sa la nivelul diferitelor structuri, precum și prin gradul său de polimerizare. Sînt metacromatice în primul rînd glucidele cu greutate moleculară mare și care prezintă o densitate mare de grupări electronegative terminale. Întrunesc aceste particularități în primul rînd MPZ sulfatate. Acestea prezintă o metacromazie constantă, în diferite grade de intensitate (în funcție de densitatea grupărilor anionice), alcoolorezistență, persisență la pH 1,5 sau chiar mai scăzut (la pH 0,5 persistă metacromazia substanței fundamentale cartilaginoase, a granulațiilor mastocitelor, precum și a mucinelor celulelor caliciforme din colon). Există însă și MPZ sulfatate, a căror metacromazie nu se poate manifesta din cauză că formează grupări glucido-proteice cu proteine bazice.

Sînt metacromatice și unele glucide bogate în grupări carboxilice ca acidul hialuronic și sialic. Metacromazia acidului hialuronic este rezistentă la alcool și nu se manifestă la valori de pH sub 4, dar condiția primordială este să depășească o concentrație locală de 1% (după unii autori chiar 5%). În practică deci, reacția metacromatică nu poate înlocui co-

Scanned with OKEN Scanner

loraţia cu albastru alcian sau reacţia cu fier coloidal în detectarea acidului hialuronic. Şi sialomucinele prezintă o metacromazie la pH 3, dar ea nu se mai manifestă la pH 1,5.

Recomandările tehnice prezentate la pag. 115 se pot aplica întocmai şi la studiul metacromaziei glucidelor. C. Velican şi col. optează, dintre toate formulele existente, pentru colorarea cu o sol. apoasă 0,5% albastru de toluidină, durata de colorare fiind adaptată fiecărui substrat în parte. Pentru permanentizarea preparatelor, aceiaşi autori recomandă tratarea secţiunilor colorate, timp de 2 min. cu un amestec în părţi egale, preparat extemporan, de sol. 5% molibdat de amoniu şi sol. 1% ferocianură de potasiu. Pentru cercetări de finețe recomandă următorul procedeu: 1. deparafinare în xilol, spălare 2×10 min. cu alcool metilic absolut; 2. tratare 10 min. cu amestec în părţi egale de apă dist. şi tetrametilenglicoleter (eter 181); 3. colorare 20—60 min. cu o sol. 0,05% albastru de toluidină dizolvat în amestecul de la punctul 2; 4. spălare 3×20 min. în tetrametilenglicoleter pur, apoi clarificare şi montare. În felul acesta coloraţia metacromatică persistă cîteva luni.

O variantă mai accesibilă este cea propusă de Bélanger şi Hertnett: 1. colorare 10 min. cu o sol. 0,5% albastru de toluidină în tampon 1,0 M de ftalat acid de potasiu-acid tartric cu pH 4,4 (dizolvarea colorantului se face lent, în 24 ore, iar înainte de folosire se va filtra); 2. spălare 2 min. cu sol. tampon; 3. deshidratare în 4 băi de 2 min. fiecare, cu alcool butilic terţiar; 4. clarificare cu xilol, montare în mediu sintetic.

Scanned with OKEN Scanner

Studiul metacromaziei în funcție de pH. Este o metodă relativ simplă, ce ne permite o caracterizare diferențiată a MPZ acide, bazată pe faptul că grupele acide puternic reactive rămîn disociate și deci produc metacromazia și la valori coborîte de pH. Prezentăm, după C. Velican și col. procedeul cu albastru de toluidină. Se prepară o serie de soluții de 0,5% albastru de toluidină tamponate cu tampon fosfat-acid citric, avînd pH-ul cuprins între 2,2—7,8 (tabelul 14). Secțiunile

Tabelul 14

pH	Fosfat disodic 0,2 M, ml	Acid citric 0,1 M, ml
2,2	4,0	196,0
2,8	31,7	168,3
3,0	41,4	158,9
3,6	64,4	135,6
4,0	77,1	122,9
4,8	98,6	101,4
5,6	116,0	84,0
6,0	126,3	73,7
7,0	164,7	35,3
7,8	191,5	8,5

se mențin 1—2 ore în tampon corespunzător fiecărei soluții colorante, după care se face colorarea propriu-zisă urmată de spălare și montare în același tampon. O metacromazie ce apare numai la

Scanned with OKEN Scanner

pH 4—7 şi dispare la valori mai coborîte pledează pentru prezenţa radicalilor carboxil sau fosfat. Aşa de exemplu, structurile bogate în acid hialuronic sau sialomucine nu mai sînt metacromatice la pH sub 3. Dimpotrivă, metacromazia persistentă la acest pH pledează pentru prezenţa esterilor sulfat în substanţe de tip heparinic, condroitin sulfaţi, keratosulfat ş.a. (tabelul 15).

E. Pearse recomandă un procedeu similar dar cu azur A în diluţie de 1 : 5000 preparate cu diferite soluţii tampon, conform tabelului 16. Durata de colorare este de 30 min. urmată de deshidratare cu alcool, alcool-xilol, xilol, montare în medii sintetice.

Tabelul 15

pH	0,5	1,5	2,0 — 3,0	3,5 — 4,0
Tipul de mucosubstanţe acide	Mucosubstanţe puternic sulfatate — substanţa cartilaginoasă; — granul. mastocitelor: — celulele caliciforme superficiale din colon	Mucosubstanţe sulfatate	1. Mucine acide nesulfatate cu grupări carboxilice puternic disociate 2. Mucine cu grupe sulfatate parţial mascate	1. sialomucine; 2. ac.hialuronic (cînd conc. sa în ţes. este crescută) 3. structuri conţinînd grupe carboxilice slab disociate (citoplasme, colagen, anumite lipide)

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 16

pH	Apă dist. (ml)	ClH 0,5 M (ml)	ClH 0,1 N (ml)	KH_2PO_4 0,1 M (ml)	Acid citric 0,1 N (ml)	Na_2HPO_4 0,2 M (ml)
0,5		50				
1,0			50			
1,5			30	20		
2,0			20	30		
2,5	48				2	
3,0	48				1,65	0,35
3,5	48				1,4	0,6
4,0	48				1,25	0,75
4,5	48				1,1	0,9
5,0	48				1,0	1,0

METODE DE BLOCAJ SPECIFIC

În acest scop se utilizează trei procedee: blocajul prin metilare urmat de saponificare, blocajul acidului sialic prin metilare moderată și blocajul grupelor carboxilice cu anhidridă acetică.

Metilarea reversibilă este un procedeu ce constă din două reacții: a) **Metilarea** prin care se suprimă reactivitatea grupărilor carboxilice și sulfatate ale MPZ acide și prin aceasta se influențează bazofilia ortocromatică și metacromatică a substratului respectiv; blocarea grupelor carboxil se face prin esterificare, ele rămîn însă atașate la molecule, în timp ce grupările sulfatate sînt desulfatate;

b) **Saponificarea** restabilește reactivitatea grupelor carboxilice esterificate dar este ineficientă pentru cea a grupelor desulfatate.

Scanned with OKEN Scanner

Metilarea urmată de colorare este un test pentru specificitatea coloraţiei. Dacă între metilare şi colorare se interpune saponificarea, este un test pentru diferenţierea MPZ-sulfatate de MPZ-carboxilice. Dispariţia metacromaziei după metilare şi reapariţia ei după saponificare, pledează pentru un substrat bogat în MPZ-sulfatate. Componenţii glucidici neanionici ca glicogenul şi MPZ neutre sînt foarte rezistenţi la metilare, reactivitatea faţă de PAS fiind abolită abia după 2—4 zile. Afinitatea MPZ acide faţă de albastrul alcian este abolită mai greu (minimum 3 ore la 58°C) decît metacromazia.

Practic se procedează astfel: 1. trei secţiuni vecine (1, 2, 3,) se deparafinează, colodinează şi se trec apoi direct în alcool etilic absolut; 2. metilare timp de 3—4 ore, în etuvă la 58°C, cu o sol. 1% HCl în alcool metilic absolut; 3. clătire cu alcool etilic absolut; 4. una din lame (1) se trece la saponificare pentru 30 min., într-o sol. 1% KOH în alcool etilic 70°, urmată de spălare cu apă dist. şi efectuarea unei tehnici pentru evidenţierea MPZ acide (metacromazia, albastru alcian etc.). Altă lamă (2), după punctul 3 se hidratează treptat, se omite saponificarea şi se trece direct la colorare. Lama (3) se colorează direct (fără metilare şi saponificare). **Rezultat:** absenţa colorabilităţii la lama 2 a unor substanţe ce apar reactive în lama 3, atestă că reacţia este datorată MPZ-acide; dacă lama 1 saponificată restabileşte reactivitatea substanţelor blocate prin metilare, în lama 2 este vorba de MPZ-carboxilice, iar dacă restabilirea reactivităţii nu are loc, este vorba de MPZ-sulfatate. **Observaţii**: riscul dezlipirii secţiunilor este mare, aşa că după punctul 3 lama 2 se poate recolodina (alcoolul metilic a dizolvat pelicula); sol. de KOH se poate înlocui cu un tratament cu barită

Scanned with OKEN Scanner

$Ba(OH)_2$, sol. apoasă 1,8% timp de 30 min. la 4°C; metilarea poate bloca grupele carboxil ale protidelor, care astfel devin electropozitive și pot inhiba într-o oarecare măsură metacromazia MPZ acide.

Varianta Korhonen cu clorură de thionil-metanol. Principiu: sol. de clorură de thionil în metanol esterifică rapid grupele carboxil și elimină foarte încet grupele sulfat. Practicîndu-se la rece, dezlipirea secțiunilor este preventivă. **Tehnica:** 1. două secțiuni vecine se deparafinează apoi se trec în alcool etilic absolut; 2. tratare 1—16 ore la 0°C cu o sol. de clorură de thionil preparată astfel: se adaugă treptat 2 ml clorură de thionil în 50 ml metanol absolut răcit la 0°C; 3. clătire repetată cu alcool absolut; 4. una din secțiuni se trece la colorare iar alta la demetilare, fie cu KOH ca în tehnica precedentă, fie prin oxidare 30 min. cu o sol. 0,5% permanganat de potasiu după care se spală cu apă distilată și se colorează. **Rezultat:** grupele carboxil sînt blocate după o metilare de 2 ore, pe cînd cele sulfatate numai după 10 ore; saponificarea cu KOH sau oxidarea cu permanganat de potasiu restabilește numai reactivitatea grupelor carboxil.

Metilarea moderată se bazează pe faptul că blocarea bazofiliei sialomucinelor se realizează ușor, în decurs de 4 ore la 37°C, în timp ce a condroitin-sulfaților și a acidului hialuronic mult mai greu, în decurs de 2—4 ore la 58°C.

Blocajul grupelor carboxilice cu anhidridă acetică se practică astfel: 1. secțiuni deparafinate, colodinate și hidratate se tratează cu un amestec de piridină-acid acetic în proporție de 25 : 15, timp de 24 ore la 60°C; 2. spălare cu apă dist. urmată de reacția metacromatică, albastru alcian etc. **Rezultat:** grupele carboxilice ale mucinelor (acid sia-

Scanned with OKEN Scanner

lic) sînt selectiv blocate prin acetilare, deci substratul ce conţine astfel de glucide nu mai este colorabil (sau metacromatic).

METOCROMAZIA INDUSĂ

Această metodă conferă o metacromazie artificială unor substanţe care în mod normal sînt ortocromatice. În urma tratamentului secţiunilor cu acid sulfuric (sau fosforic), grupările hidroxil sînt esterificate prin grupări puternic electronegative (sulfat, fosfat), fapt ce explică apariţia metacromaziei. Această esterificare abolește reactivitatea față de PAS și intensifică metacromazia deja existentă. Efectele ei sînt reversibile prin metilare (pag. 295).

Prin metacromazia indusă se evidenţiază, în general, substanţele PAS pozitive, mai greu glicogenul. Acidul hialuronic care obișnuit, pe secţiuni, este PAS-negativ și nemetacromatic, dobîndește metacromazia prin esterificare. Devin metacromatice și unele lipide persistente după includerea în parafină. Metoda metacromaziei induse nu trebuie utilizată în locul reacţiei PAS: este mai complicată și nu are un contrast optic la fel de bun. Ea prezintă totuși unele avantaje: evidenţiază mai bine substanţa fundamentală din ţesutul nervos, membranele bazale și mai ales fibrele de reticulină, care în reacţia PAS se deosebesc greu de fibrele colagene subţiri (după sulfatare reticulina apare metacromatică, iar colagenul ortocromatic); permite evidenţierea acidului hialuronic, precum și o colorare metacromatică puternică, foarte contrastantă, a organismelor fungice. Analiza reacţiei se face comparativ: o lamă tratată cu PAS, una colorată pentru metacromazie directă și alta colorată la fel dar după sulfatare.

Scanned with OKEN Scanner

Inducerea metacromaziei se face mai ales prin tratarea secţiunilor cu acid sulfuric în amestec cu alte substanţe care să-i atenueze efectul distructiv asupra ţesuturilor. Se recomandă următoarele procedee de sulfatare, secţiunile astfel tratate urmînd să fie spălate cu apă şi colorate cu albastru de toluidină sau azur A (pag. 115, 294).

a) **Secţiuni deparafinate şi uscate** se tratează 3 min. cu un amestec în părţi egale de acid sulfuric şi anhidridă acetică. Acidul sulfuric se adaugă picătură cu picătură în anhidrida răcită la 0°C.

b) **Secţiuni deparafinate se trec în alcool absolut,** se spală cu eter anhidru apoi se tratează aprox. 5 min. cu un amestec în părţi egale de acid sulfuric şi eter anhidru sau 35 ml anhidridă acetică, 15 ml eter şi 50 ml acid sulfuric. Amestecul se prepară cu precauţia specificată mai înainte.

c) **Secţiunile deparafinate se trec în alcool absolut,** apoi într-un amestec 1 : 1 de alcool-ac.acetic glacial, după care se tratează timp de 10 min., la 0°C, cu un amestec în părţi egale de acid sulfuric şi acid acetic glacial, agitînd lamele periodic. Urmează spălare 2—3 min. cu acid acetic şi apoi cu apă.

Interpretarea reacţiei: o metacromazie intensă după colorare directă, nemodificată prin sulfatare, indică drept substrat MPZ puternic sulfatate. O metacromazie slabă, după colorare directă dar intensificată prin sulfatare indică prezenţa unor MPZ slab sulfatate. Absenţa metacromaziei, după colorarea directă, dar apariţia ei în urma sulfatării evidenţiază MPZ neutre şi MPZ acide nesulfatate.

Scanned with OKEN Scanner

OXIDAREA

Dacă se practică reacţia metacromatică după o prealabilă oxidare a secţiunilor cu acid periodic, la fel ca pentru reacţia PAS, se obţine apariţia sau intensificarea bazofiliei unor substraturi. Se consideră că, prin oxidare, are loc o transformare a grupelor glicol în aldehide şi apoi a acestora în grupe carboxil, înmulţirea acestora din urmă avînd ca efect creşterea bazofiliei. Oxidarea nu modifică bazofilia MPZ-sulfatate, în schimb poate evidenţia acidul hialuronic care, atunci cînd nu depăşeşte concentraţia în ţesuturi de 1% nu reacţionează la metacromazia directă.

METACROMAZIA FORŢATĂ

Este un procedeu prin care se poate anula efectul de blocare pe care-l au proteinele asupra reacţiei metacromatice a MPZ-acide. Metoda constă din colorarea secţiunilor deparafinate şi hidratate, timp de 3 ore, la 70°C, cu o sol. 3% albastru de toluidină tamponată la pH 2,9. Apariţia metacromaziei forţate pledează cu multă probabilitate pentru un substrat format din complexe de proteine MPZ-acide.

Metoda Solcia-Bussolati, pentru metacromazia mascată preconizează fixarea unor probe mici, timp de 24 ore, în: 3 p sol. apoasă saturată de ac. picric; o p. sol. apoasă 25% glutaraldehidă şi acetat de sodiu în proporţie de 1%; după includere în parafină şi secţionare se practică o hidroliză la 60°C cu HCl 5 N timp de 10 min. (durata optimă va fi stabilită prin tatonare) urmată de spălare, colorare cu albastru de toluidină (pag. 294) sau cu coriphosphine O. (308).

Scanned with OKEN Scanner

Enzimele cele mai utilizate pentru controlul sau creşterea specificităţii unor reacţii din histochimia polizaharidelor sînt: amilazele, hialuronidazele şi neuramidazele. Alte enzime ca B-glucuronidaza, pectinazele, heparinazele, condrosulfataza ş.a. nu au intrat încă în practica curentă.

a) **Amilazele** reprezintă un mijloc sigur de control al reacţiilor pentru glicogen şi amidon.

α — amilazele salivară şi pancreatică sînt preparate sub formă cristalizată şi sînt active la un pH optim de 6,9. Clorura de sodiu are un efect activator.

β — amilazele sînt de origine exclusiv vegetală. α şi β amilazele purificate sînt foarte scumpe, aşa că în practică se utilizează preparatele comerciale de diastază de malţ care conţin un amestec de α şi β amilaze.

Metoda Lillie cu diastază de malţ: 1. secţiuni deparafinate, **necolodinate** şi hidratate se tratează timp de 1 oră la 37°C cu o sol. 1% diastază de malţ în apă dist. sau, mai bine, în amestecul: fosfat monopotasic monohidratat 0,8 g, fosfat disodic anhidru 1,3 g, clorură de sodiu 8 g, apă dist. 1000 ml; 2. spălare cu apă dist.; secţiunile acoperite cu sol. enzimatică se depun pe fundul unui cristalizator în care, pentru prevenirea evaporării, aşezăm un tampon de vată îmbibat cu apă, apoi se acoperă totul cu un capac; 3. deshidratare cu alcool absolut sau acetonă, urmată de colodinare; 4. colorare sau reacţie pentru glicogen efectuată şi pe o secţiune care n-a fost supusă digestiei enzimatice. **Rezultat:** conţin glicogen zonele colorate în secţiunea martor şi

Scanned with OKEN Scanner

necolorate în cea tratată cu diastază. **Observaţii:** extracţia enzimatică se poate face şi cu salivă filtrată, durata de acţiune fiind de 15—30 min. Atunci cînd se practică coloraţia cu carmin Best (pag. 310), controlul cu diastază este posibil şi fără lamă martor: secţiunea sau frotiul colorat se examinează (eventual fotografiază), apoi se dezlipeşte lamela şi se practică digestia enzimatică. Astfel se elimină glicogenul colorat dar nu şi alte substanţe care s-au colorat cu carmin Best.

La examinarea preparatelor se va ţine seama de faptul că atît saliva umană, cît şi preparatele de diastază de malţ conţin şi ribonuclează. Preparatele comerciale de diastază îşi pierd cu timpul eficacitatea, aşa că este prudent să le verificăm aplicînd extracţia enzimatică pe o secţiune dintr-un organ care conţine în mod sigur glicogen (ficat proaspăt recoltat).

b) **Hialuronidazele** permit diferenţierea acidului hialuronic de alte mucopolizaharide acide. Există mai multe varietăţi de hialuronidaze, diferite ca origine, substrat specific şi mod de acţiune. Se utilizează mai adesea hialuronidază testiculară care extrage mai rapid acidul hialuronic şi mai lent acidul condroitin sulfuric A şi C (precum şi condroitinul). Hialuronidaza bacteriană acţionează asupra acidului hialuronic şi condroitinului şi nu extrage acizii condroitin sulfurici A şi C decît după desulfatare. Acidul condroitin sulfuric B nu este extras nici după desulfatare. Hialuronidaza din lipitori nu acţionează decît asupra acidului hialuronic.

Pentru digestia cu hialuronidază testiculară se recurge la fixarea cu formol neutru tamponat, al-

Scanned with OKEN Scanner

cool sau Carnoy şi includere în parafină; secţiunile hidratate se incubează la 37°C într-un mediu format din tampon de acetaţi sau fosfaţi cu pH 6,0 sau numai din ser fiziologic salin în care se adaugă enzima în proporţie de 0,3—0,5 mg/ml. durata incubării variază între 30 min. şi 6—24 ore, lucru ce depinde în mare măsură de calitatea preparatului enzimatic. Concomitent se va trata o secţiune vecină, în mod identic, doar că incubarea se face numai în solventul enzimei. În final cele două lame care au stat la incubare, precum şi o a treia, care nu se incubează, vor fi colorate 5—20 min. cu o sol. apoasă 0,5% albastru de toluidină cu pH 5,0.

După observaţiile lui C. V e l i c a n, prin incubaţii scurte, sub 30 min., se extrage doar acidul hialuronic, pe cînd prin incubare prelungită (1—24—48 ore) se extrage şi acidul condroitin sulfuric A şi C. Natura substratului extras de enzimă se precizează prin teste suplimentare: reversibilitatea metacromaziei după metilare şi saponificare şi dispariţia ei la pH sub 3 pledează pentru MPZ acide nesulfatate, pe cînd nereversibilitatea metacromaziei şi persistenţa ei la acest pH indică un substrat format de MPZ acide sulfatate. O metodă foarte expeditivă, elaborată de C. V e l i c a n, este următoarea: 1. se efectuează pe un preparat coloraţia cu albastru de toluidină sol. 0,5% timp de 3—5 min. şi se fotografiază preparatul imediat; 2. se detaşează lamela şi se decolorează secţiunea cu alcool acidulat cu cîteva picături de HCl; se spală abundent cu apă, după care se face digestia cu hialuronidază timp de 30 min.; se recolorează ca prima dată şi se refotografiază aceleaşi cîmpuri; 3. se repetă operaţiile de la punctul 2, doar că incubarea cu hialuronidază se prelungeşte la 3 ore; 4. se repetă operaţiile de la punctul 2 cu incu-

Scanned with OKEN Scanner

bare de 24 ore. **Rezultat:** se apreciază comparînd fotografiile succesive.

Hialuronidaza bacteriană poate fi preparată în laboratoarele de bacteriologie și se utilizează în concentrație de 250 unități R. V Julius la 100 ml ser fiziologic. Incubarea se face tot la 37°C timp de 1—24 ore, urmată de colorarea cu albastru de toluidină. Lama de control se incubează la fel, dar într-o cantitate mică de sol. din care enzima a fost inactivată prin fierbere. Dacă se constată dispariția metacromaziei pe ambele lame, este semn că a fost blocată de către proteinele mediului de incubare, fapt ce poate fi verificat prin aplicarea metacromaziei forțate (pag. 302).

c) **Neuramidazele** sînt complexe enzimatice care catalizează clivajul hidrolitic al acizilor neuraminic și sialic din complexul molecular al MPZ. Enzima este activată de ionii de calciu și are pH optim între 5,4—5,9. Se aplică pe probe fixate în formol la rece, secționate la criotom sau incluse în parafină: 1. secțiuni deparafinate și hidratate se tratează timp de 16—24 ore la 39—41°C în amestecul: sol. neuramidază 500 unități/ml diluată în părți egale cu tampon acetat 0,1 M cu pH 5,5 care conține și 1% ClNa și 0,1/$CaCl_2$. O secțiune de control se incubează numai în tampon acetat 0,05 M; 2. spălare cu apă distilată urmată de efectuarea reacției PAS, albastru alcian și metacromatică.

Hidroliza acidului sialic se poate realiza și pe cale chimică: a) tratarea secțiunii timp de 1—2 ore, la 55—75°C cu tampon acetat pH 2,5 sau b) tratarea secțiunii timp de o oră, la 60—80°C cu soluția 0,1 N de SO_4H_2. Se practică la urmă colorațiile menționate mai sus.

Scanned with OKEN Scanner

5. METODE DE FLUORESCENȚĂ

O serie de fluorocromi au calitatea de a se fixa pe grupările acide ale mucopolizaharidelor și prin aceasta să favorizeze evidențierea lor selectivă.

METODE CU ACRIDIN OARNJ. **Principiu:** pretratamentul probelor cu clorură ferică, alaun de fier sau hematoxilină ferică inhibă fluorescența a numeroase substraturi, lăsînd să apară fluorescente numai mucinele acide. **Tehnica:** 1. fixare cu formol, includere în parafină; 2. secțiuni deparafinate și hidratate se tratează 5—10 min. cu o sol. 4% alaun de fier sau sol. 30% clorură ferică; 3. spălare 3 min. cu apă; 4. colorarea 2. min. cu o sol. apoasă 1 : 1000 acridin oranj; 5. clătire rapidă cu apă dist., montare în glicerină și examinare în ultraviolet. **Variantă:** 1. se practică în prealabil colorația tricromică Masson, colorația nucleară făcîndu-se cu hematoxilină ferică, apoi se continuă de la punctul 4 ca mai sus. **Rezultat:** mucosubstanțele acide sînt evidențiate printr-o fluorescență roșie-oranj strălucitoare.

METODA CU CORIFOSFINĂ O. 1. secțiuni din probe fixate cu formol și incluse în parafină se mordansează 10 min. cu sol. 4% alaun de fier apoi se spală cu apă dist.; 2. colorare 20 min. cu sol. 0,01% corifosfină pH 6,0; 3. clătire cu apă dist. deshidratare cu alcool izopropilic, clarificare cu xilol, montare în DPX. **Rezultat:** sulfomucinele emit o fluorescență verzuie. **Variantă:** dacă după colorare cu corifosfină și spălare cu apă dist. se practică o colorare de 1 min. cu sol. 0,001% galben tiazol la pH 2,0, sulfomucinele emit o fluorescență portocalie, iar nucleii verde.

Scanned with OKEN Scanner

D. METODE DE COLORARE COMBINATE

Metodele de colorare combinate se utilizează fie cu scopul de a evidenţia concomitent MPZ-neutre şi acide, fie de a diferenţia pe aceeaşi secţiune, diferitele tipuri de MPZ acide.

a) Metoda cu fier coloidal — PAS: se începe cu o reacţie cu fier coloidal (pag. 287), se spală secţiunile cu apă, apoi se continuă cu reacţia PAS (pag. 269).

b) Metoda cu albastru-alcian-PAS: se începe cu colorarea cu albastru alcian (pag. 285), apoi se continuă cu reacţia PAS.

c) Metoda cu albastru alcian-paraldehidă-fucsină: se începe cu albastru alcian, se spală secţiunile cu apă apoi se continuă cu paraldehidă-fucsină (pag. 290).

d) Metoda cu albastru alcian-galben alcian (pag. 286).

E. EVIDENŢIEREA DIFERITELOR VARIETĂŢI DE GLUCIDE

METODA OKAMOTO-MÜLLER PENTRU GLUCOZĂ. **Principiu:** tratamentul probelor cu o sol. saturată de hidroxid de bariu în alcool metilic insolubilizează glucoza sub forma unei combinaţii complexe, care ulterior este vizualizată cu o sol. de nitrat de argint. **Reactivi:** 1. sol. saturată de hidroxid de bariu în alcool metilic; 2. alcool etilic absolut 90 ml, sol. apoasă 20% azotat de argint 10 ml; 3. alcool etilic absolut 90 ml, formol conc. 10 ml. **Tehnica:** 1. probe, cu dimensiuni foarte mici (2 mm) se fixează imediat după recoltare timp de 24 ore la —10°C

Scanned with OKEN Scanner

în sol. 1; 2. deshidratare cu alcool absolut; 3. clarificare rapidă în trei băi de benzoat de metil, benzen, benzen-parafină, parafină. 4. secționare la 10 microni, etalare uscată pe lame albuminizate; 5. încălzirea lamelor în etuvă la 56—58°C pînă la topirea peliculei de parafină; 6. deparafinare cu clorofom, apoi alcool absolut; 7. tratare 30 min. cu sol. 2; 8. spălare repetată cu alcool 96; 9. reducere cîteva secunde cu sol. 3; 10. hidratare treptată cu alcool 96°, 70° și apă dist.; 11. fixare 30 sec. cu o sol. 5% tiosulfat de sodiu; 12. spălare cu apă, deshidratare cu alcool, clarificare cu xilol, montare în mediu sintetic. **Rezultat:** substraturile ce conțin lactoză, glucoză sau galactoză se impregnează în negru. **Observații:** verificarea reacției se face dizolvînd ozele prin menținerea unei lame de control în apă dist. înainte de tratament cu sol. de azotat de argint. Sensibilitatea reacției crește dacă fixarea se face cu același amestec dar la —70°C (congelare-substituție), sau dacă probele congelate se secționează la criotom și fixarea se face pe secțiuni la —22°C.

Metoda Blumer (pas-dimedon) pentru glicogen. **Principiu:** tratarea secțiunilor, după oxidare cu acid periodic, cu o sol. de dimetil-5,5 ciclohexandion-1,3 (dimedon) suprimă reactivitatea substanțelor PAS-pozitive, cu excepția glicogenului. **Reactivi:** 1. sol. 5% dimedon în alcool etilic absolut; 2. reactivii necesari reacției PAS (pag. 269). **Tehnica:** 1. fixarea adecvată pentru conservarea glicogenului (pag. 266), includere în parafină; 2. secțiuni deparafinate cu xilol, se colodinează, apoi se oxidează 10 min. cu acid periodic 3. spălare cu apă, cu alcool 70°, 96° și apoi absolut; 4. tratare 3 ore la 60° cu sol. 1; 5. spălare cu alcool absolut, 96°, 70° și la urmă cu apă dist.; 6. tratare 10 min. cu reactiv Schiff și apoi continuarea mano-

Scanned with OKEN Scanner

perelor reacției PAS. **Rezultat:** glicogenul se colorează în roșu.

METODA CU CARMIN BEST PENTRU GLICOGEN. Este vorba de o metodă empirică ce prezintă însă avantajul de a furniza preparate cu un foarte bun contrast optic. Controlul prin digestie enzimatică este obligatoriu deoarece, uneori, mai ales după colorările prelungite, se colorează și unele MPZ. **Reactivi:** 1. carmin Best (sol. mamă): 60 ml apă distilată, 2 g carmin, 1 g carbonat de potasiu și 5 g clorură de potasiu; după dizolvare se fierbe sol. timp de 5 min., se răcește, se filtrează, apoi se adaugă 20 ml amoniac; sol. mamă se conservă la 0—4°C timp de 3 luni; 2. sol. de lucru se prepară amestecînd 15 ml sol. mamă, 12,5 ml amoniac și 12,5 ml alcool etilic absolut; se conservă la rece 2—3 săptămîni; 3. diferențiatorul Best: 20 ml alcool etilic absolut, 10 ml alcool metilic, 25 ml apă dist. **Tehnica:** 1. fixare pentru glicogen (pag. 266), includere în parafină; 2. secțiuni deparafinate, **colodinate** și hidratate se colorează cu hemalaun Böhmer, Mayer etc. sau cu hematoxilină Groat timp de 5 min.; 3. spălare cu apă dist. virare cu carbonat de litiu, apoi iarăși clătire cu apă dist.; 4. colorare 15 min. cu sol. 2; 5. diferențiere cu sol. 3 pînă se elimină excesul de colorant (5—60 sec.); 6. clătire cu alcool 80°; 7. deshidratare, clarificare, montare. **Rezultat:** glicogenul se colorează în roșu intens; se colorează de asemenea, dar mai palid, galactogenul, mucinele, granulațiile mastocitelor și fibrina.

REACȚIA CU IOD PENTRU GLICOGEN. VARIANTA MANCINI. **Principiu:** iodul formează cu polizaharidele complexe diferit colorate, în funcție de lungimea și gradul de ramificație al acestora: cafeniu-roșcat cu glicogenul, albastru cu amidonul. **Reactivi:** 1. ulei de

Scanned with OKEN Scanner

vaselină saturat cu iod metalic; 2. xilol 9 ml, 1 ml sol. 2% iodură de mercur în alcool absolut; amestecul se prepară extemporan, iodura de mercur dizolvîndu-se complet doar dacă se adaugă o cantitate foarte mică de iodură de potasiu. **Tehnica:** 1. rezultate optime se obţin pe preparate tratate prin congelare-deshidratare; dacă nu există această posibilitate se face fixarea adecvată pentru glicogen şi includere în parafină; 2. secţiuni deparafinate **numai** cu xilol, se acoperă cu o pictură din sol. 1, apoi cu o lamelă şi se lasă astfel 3—24 ore; 3. se îndepărtează lamela, se sugativează uleiul din **jurul** secţiunii şi se acoperă secţiunea, timp de 2—5 min. cu sol. 2; 4. se sugativează reactivul şi se montează secţiunea într-o picătură de sol. 1. **Rezultat:** glicogenul (şi amiloidul) se colorează în cafeniu-roşcat, iar amidonul în albastru. **Observaţii:** caracterizarea sigură a glicogenului este dată de reacţia puternic PAS-pozitivă ce dispare după digestia cu amilază (pag. 303), coroborată cu reacţia pozitivă la iod. PAS-pozivitatea glicogenului dispare de asemenea, dacă înainte de reactivul Schiff se practică o blocare a aldehidelor (pag. 124); ea dispare după acetilare şi reapare după saponificare (pag. 279); glicogenul devine bazofil şi cromotrop după esterificare sulfurică (pag. 300). Diferenţierea galactogenului faţă de glicogen este posibilă prin faptul că acesta nu dă reacţia cu iodul şi nu este digerat de diastaza de malţ şi nici de amilaza salivară.

REACŢIA SCHULZE CU CLORURĂ DE ZINC-IODATĂ, PENTRU CHITINĂ ŞI CELULOZĂ. **Principiu:** aceste polizaharide se colorează caracteristic în violet prin tratarea cu sol. de clorură de zinc-Lugol. **Reactivi:** 1. sol. Schulze A: 2 g iod, 10 g iodură de potasiu 30 ml apă dist.; 2. sol. Schulze B: 60 g clorură de zinc; 30 ml apă dist.;

Scanned with OKEN Scanner

pentru reacţie se amestecă cele două soluţii, se filtrează prin vată de sticlă; sol. este eficace dacă colorează hîrtia de filtru în violet. **Tehnica:** 1. secţiuni deparafinate şi hidratate se montează în sol. Schulze A+B şi se examinează imediat. **Rezultat:** celuloza se colorează în violet. Colorarea chitinei este posibilă dacă se tratează secţiunea timp de 24 ore, la întuneric, cu ac. clorodioxiacetic sau Diafanol. După spălare abundentă cu apă se aplică reactivul Schulze. În acest caz diferenţierea celulozei de chitină se face după colorare, picurînd pe secţiune sol. 1—2% de SO_4H_2: celuloza se va colora în albastru, în timp ce chitina virează spre cafeniu. **Observaţii:** ca şi glicogenul, celuloza este intes PAS-pozitivă dar rezistă la digestia cu amilaza.

MUCOPOLIZAHARIDELE NEUTRE. S-a arătat în acest capitol că aceste substanţe sînt PAS-pozitive, îşi pierd această reactivitate după metilare şi o redobîndesc după saponificarea secţiunilor metilate. Nu se colorează cu albastru alcian şi nici cu soluţiile de fier coloidal. Devin paraldehido-fucsino-pozitive doar după preoxidare şi dobîndesc metacromazia după esterificare sulfurică. Nu sînt extrase prin digestia cu diastază de malţ.

O altă tehnică de identificare a MPZ-neutre este **carboxilarea,** prin care se introduc în molecule grupări carboxil, astfel încît MPZ netutre se pot ulterior colora ortocromatic sau metacromatic cu albastru de toluidină.

METODA SHAKLEFORD se practică astfel: 1. secţiuni hidratate se oxidează 5 min. cu ac. periodic; 2. spălare cu apă; 3. tratare 1 oră la 58°C cu sol. saturată de acid-p-hidrazinbenzoic în piridină anhidră; 4. spălare cu alcool, hidratare şi colorare cu albastru de toluidină. Carboxilarea se poate obţine

Scanned with OKEN Scanner

și prin tratarea secțiunilor timp de 1 oră la 58°C cu o sol. saturată de anhidridă succinică în piridină anhidră.

Mucopolizaharidele acide. Evidențierea lor se bazează pe studiul grupărilor electronegative: sînt metacromatice: se colorează cu albastru alcian sau coloranți din aceeași grupă, fixează ionii de fier din sol. coloidale. Blocarea acestor proprietăți se realizează prin metilare. Unele sînt PAS-negative iar altele PAS-pozitive, acestea din urmă pierzîndu-și această calitate după acetilare.

Reacțiile pentru caracterizarea MPZ acide sulfatate și nesulfatate au fost prezentate și comentate în acest capitol.

Rezultă că în această grupă foarte complexă a glucidelor, caracterizarea diferitelor tipuri sau grupe de glucide necesită utilizarea sistematică a unui număr relativ mare de reacții, rezultatul stabilindu-se prin comparație.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL IX

LIPIDELE

În studiul lipidelor trebuie să abordăm atît forma lor de depozit, de constituenți celuluari, cît și a cataboliților acestora. Grupul de substanțe denumit **„lipide"** este foarte greu de definit, deoarece proprietățile fizice și chimice foarte diferite fac dificilă adoptarea unei nomenclaturi unitare. Pentru o ușurare a abordării problemei propuse vom adopta clasificarea dată de L i s o n și în general acceptată în histochimie:

1. **Gliceridele** sînt triesteri ai glicerolului cu acizi grași;
2. **Ceridele** sînt esteri ai alcoolurilor alifatici cu mai mult de 10 atomi de carbon, cu acizi grași;
3. **Fosfolipidele** au în molecula lor un radical al acidului fosforic, care esterifică unul din hidroxilii glicerolului; din grupul fosfolipidelor fac parte: lecitinele, cefalinele și plasmalogenele;
4. **Sfingolipidele** conțin un amino-dialcool cu 18 atomi de carbon; aici sînt cuprinse: sfingomielinele, cerebrozidele, gangliozidele etc.
5. **Steroidele** din punct de vedere chimic se caracterizează prin nucleul ciclopentafenantrenic; în organism se găsesc: colesterolul și esterii săi și hormonii steroizi;

Scanned with OKEN Scanner

6. **Carotenoidele** sînt hidrocarburi care au culoare naturală și se caracterizează din punct de vedere chimic prin gruparea ciclică sau aciclică a radicalului izoprenic cu dublă legătură conjugată;

7. **Cromolipoidele,** puțin cunoscute din punct de vedere chimic, sînt pigmenți derivați din lipide prin oxidare; reprezentanții acestui grup sînt: lipofuscinele și hemofuscinele.

Această clasificare nu satisface pe histochimiști, deoarece este simplu de decelat lipidele de depozit sau reziduurile catabolice, dar mai complicat cînd este vorba despre asociația lor cu produși nelipidici. În aceste asociații își pierd în bună parte, sau total, caracterele care premit detectarea lor. Ceea ce interesează pe histochimiști este, mai puțin identificarea chimică a lipidelor, ci forma și starea sub care se găsesc lipidele în țesuturi.

L. Lison deosebește două grupe, lipide homofazice și lipide heterofazice. **Lipidele homofazice** există în citoplasmă în stare de lipide unic constituite, apărînd întotdeauna separat de faza hidrofilă a citoplasmei cu care nu se amestecă. Ele apar sub formă de picături bine delimitate. O proprietate importantă a lor este că sînt stabile față de pretratamentele efectuate înaintea analizei histochimice. În principiu nu au nevoie de fixare. **Lipidele heterofazice** există în stare de fază mixtă, sînt lipide legate de elemente nelipidice. În stare naturală există nu sub forma unei faze lipidice unice, ci și sub formă de complexe, în asociație cu elemente nelipidice. Comportamentul histochimic al lipidelor heterofazice diferă mult de cel al lipidelor homofazice. Datorită legării de alte substanțe nelipidice ele sînt mascate, necesitînd pentru vizualizarea lor demascarea sau provocarea unei „lipofaneroze".

Scanned with OKEN Scanner

Fixarea: în cercetările curente ale lipidelor homofazice se practică fixarea în formol 10% și apoi secționarea prin congelare. Fixarea se mai poate face cu fixatori ce conțin bicromat și cu cei cu tetraoxid de osmiu.

Lipidele heterofazice se recomandă a fi fixate în: formol-calciu, după Baker (pag. 23); b) fixator osmic la care se adaugă săruri de calciu; a fost preconizat în microscopia electronică pentru particule submicroscopice de lipide heterofazice; c) fixatori pe bază de bicromat și postcromizări. Acești fixatori imobilizează fosfo- și sfingolipidele. După Ciaccio se utilizează: sol. 5% bicromat de potasiu 80 ml; formol conc. 10 ml; acid acetic 5 ml; fixarea durează 2 ore.

Postcromizarea se poate efectua la temp. laboratorului, într-o sol. apoasă 3% de bicromat de potasiu, timp de 5—8 zile. Baker propune o postcromizare timp de 18 ore la temp. laboratorului, apoi 24 ore la 60°C, într-o sol. apoasă 5% de bicromat de potasiu în care se dizolvă pînă la concentrația de 1% clorură de calciu.

Elftman propune următoarea metodă de postcromizare controlată: fragmente fine de țesut proaspăt se pun în următorul amestec: bicromat de potasiu 5 g; sol. apoasă de acetat de sodiu M/5 (2,7 g%) 7 ml; acid acetic M/5 (1,2%) 93 ml. Postcromizarea se face la 56°C timp de 18 ore, urmată de spălare în apă curentă timp de 6 ore, deshidratare și includere în parafină.

Lipidele heterofazice fiind legate cu substanțe nelipidice sînt mai greu de vizualizat, ele necesită demascarea sau lipofaneroza. Demascarea lipidelor heterofazice trebuie să aibă în vedere păstrarea morfo-

Scanned with OKEN Scanner

logiei celulare, astfel încît să putem localiza exact lipidele cercetate.

Demascarea lipidelor se poate face în timpul fixării cu ajutorul unor fixatori ca: sărurile de mercur, de cadmium, de uraniu, de cobalt, de zinc și alcoolurile etilice și metilice diluate. Formule ideale de fixatori-demascanți de lipide sînt cea propusă de Cajal (formol-uraniu) și cea propusă de Da Fano (formol-cobalt). Demascarea lipidelor se poate face și după fixarea în formol cu ajutorul soluțiilor acide sau alcaline: fenolul, digestia pepsinică și tripsinică. Se recomandă procedeul cu fenol. După lipofaneroză se va proceda la cromizare și apoi colorarea după una din tehnicile menționate.

Ca și în cazul proteinilor și glucidelor și în evidențierea histochimică a lipidelor se apelează la reacții sau colorații generale, reacții pentru anumiți radicali (carbonil, sterol), reacții pentru evidențierea caracterului acid, nesaturat etc., reacții pentru componenta glucidică, protidică. Utilizarea asociată a acestor diferite metode, precum și aplicarea unor tehnici de control prin extracții diferențiate ne permite în final să identificăm cantități chimice bine definite sau grupe mai restrînse de lipide.

A. COLORAȚII GENERALE PENTRU LIPIDE

În această grupă de metode se cuprind cele bazate pe utilizarea lizocromilor (Sudan II, III, IV sau Scharlach R, Oil Red O, Sudan negru B, albastru BZL etc.). Aceste substanțe nu ne dau decît foarte puține indicații referitoare la constituția chimică a lipidelor, evidențierea acestora fiind bazată doar pe

Scanned with OKEN Scanner

dizolvarea lizozomilor în acele lipide care la temperatura laboratorului rămîn în stare lichidă.

O problemă importantă este alegerea solventului care, prin natura sa, nu trebuie să extragă lipidele. Se lucrează în general cu alcool etilic de 55—60° dar rezultatele cele mai bune se obţin cu alcoolul izopropilic 99%.

În prezent Sudanul III şi Scharlach R prezintă mai mult un interes istoric, căci metodele cu Sudan negru B şi în special cu albastru BZL s-au dovedit net superioare.

Metodele de colorare se aplică pe secţiuni prin congelare din probe fixate cu fixatori pentru lipide, pe secţiuni de probe proaspete (fixarea făcîndu-se ulterior, pe secţiuni) sau pe secţiuni din probe incluse în parafină după o prealabilă insolubilizare a lipidelor cu bicromat de potasiu (pag. 316).

a) **Prepararea soluţiilor cu alcool etilic.** Se lucrează cu soluţii proaspete saturate (aprox. 0,3%) de Sudan III, IV, albastru BZL sau Sudan negru B în alcool etilic 55—60°. Numai ultimul colorant necesită la sfîrşitul coloraţiei o scurtă diferenţiere cu alcool 60°.

b) **Prepararea soluţiilor cu alcool izopropilic.** Se prepară soluţii saturate de lizocromi (aprox. 250—500 mg%) în alcool izopropilic 99%. Soluţia se păstrează bine luni de zile, în sticle bine închise. Pentru lucru se dizolvă soluţie mamă cu apă dist. în proporţie de 6 : 4.

Pe tot parcursul colorării se va evita evaporarea soluţiilor colorante (recipiente închise), fapt ce duce la apariţia unor precipitate foarte supărătoare.

METODA DE COLORARE CU SUDAN III, SUDAN IV, ALBASTRU BZL şi OIL RED O, în soluţie alcoolică): 1. secţiunile se trec în alcool 70° timp de cîteva secunde; 2. secţiu-

Scanned with OKEN Scanner

nile se trec într-o sol. saturată de Sudan sau Oil red O în alcool 70° timp de 5 min.; 3. secțiunile se trec pentru clătire în cîteva reprize de alcool 70° pînă cînd nu se mai văd nori de colorant; 4. se spală în apă; 5. se colorează nucleii cu hemalaun sau cu albastru de toluidină sol. 0,5%; 6. se spală în apă; 7. se montează cu glicerogel sau în siropul Apathy.

METODA DE COLORARE CU SUDAN NEGRU B (ÎN SOL. ALCOOLICĂ). 1. secțiuni la congelare, libere sau lipite pe lame (eventual secțiuni la parafină, hidratate) se tratează 20—30 sec. cu alcool etilic 50—60°; 2. colorare 5—30 min. cu sol. saturată de Sudan sau negru B în alcool 50—60°; sol. se conservă 2—3 săptămîni; 3. diferențiere aprox. 30 sec. în alcool 60°; 4. clătire cu apă dist.; 5. colorare nucleară cu Kernechtrot, clătire cu apă, montare în mediu hidrosolubil.

METODA CU LIZOCROMI DIZOLVAȚI ÎN ALCOOL IZOPROPILIC: 1. ca în tehnica precedentă; 2. tratare timp de 10 min. cu sol. proaspăt preparată: 6 p lizocrom sol. mamă și 4 p apă dist.; se agită 20—30 sec. apoi se lasă în repaus 10 min. după care se filtrează; 3. clătire cu apă, colorație nucleară, spălare cu apă, montare într-un mediu hidrosolubil.

EVIDENȚIEREA LIPIDELOR PRIN LIZOCROMI FLUORESCENȚI: lizocromii fluorescenți au avantajul de a evidenția cantitățile infime de lipide, iar faptul că piesa nu este tratată cu solvenți ai lipidelor determină conservarea fidelă a lipidelor tisulare. Dezavantajul constă în imposibilitatea păstrării preparatului și examinarea la lumina ultravioletă.

METODE DE COLORARE CU FOSFINA-3 R DUPĂ POPPER: 1. piese fixate în formol 10% sau în formol calciu (Baker) se secționează la gheață; 2. secțiunile se tra-

Scanned with OKEN Scanner

tează cu o sol. apoasă 0,1% fucsină R, timp de 3 min.; 3. se clătesc rapid în apă distilată; 4. se montează cu glicerină; 5. se examinează și se fotografiază la lumină ultravioletă. **Rezultat:** prezența de lipide, cu excepția acizilor grași, săpunurilor și colesterolului, precum și prezența esterilor colesterolului se traduce printr-o fluorescență albă;

METODA DE COLORARE CU 3,4-BENZOPIREN DUPĂ BERG: **Reactivi:** sol. de benzopiren: se adaugă la 100 ml sol. saturată și filtrată de cofeină (în jur de 1,5%) 0,002 g de 3,4 benzopiren, se lasă în repaus timp de 48 de ore la 37°C, se filtrează și se diluează cu 100 ml apă dist.; se lasă în repaus 2 ore și apoi se filtrează. Sol. se poate conserva mai multe luni într-un flacon brun, bine închis și la rece. **Tehnica:** 1. piesa fixată în formol 10% sau formol-calciu se secționează la gheață; 2. secțiunile se tratează cu sol. de benzopiren timp de 20 min.; 3. se spală rapid în apă dist.; 4. se montează în apă, se examinează și se fotografiază în lumina ultravioletă. **Rezultat:** toate lipidele, chiar și picăturile foarte fine, dobîndesc o fluorescență albastră sau albastră-albicioasă intensă, dar trecătoare.

B. TEHNICI DE EXTRAGERE A LIPIDELOR

Controlul prin extracție al reacțiilor histochimice pentru lipide nu prezintă siguranță suficientă, deoarece fixarea modifică substanțial solubilitatea lipidelor. Dintre procedeele de solubilizare diferențiată se mențin doar cele pentru fosfolipide și sfingolipide, substanțe insolubile în acetonă.

Scanned with OKEN Scanner

TEHNICA DE EXTRAGERE DIFERENȚIATĂ A LIPIDELOR DUPĂ KEILIG: această metodă se apropie mult de analizele chimice, în plus rezultatele se apreciază la gheață, colorate cu negru de Sudan B, ceea ce face să se evite erorile secțiunii la parafină. Se vor recolta piese foarte fine (minimum 3 mm) din țesutul proaspăt și se vor trata cu următorii solvenți; acetona rece, extrage gliceridele și steroizii; acetona alcoolică extrage și cerebrozidele și lipidele enunțate anterior; amestecul metanol și cloroform în părți egale, la fierbere, extrage lipidele în ansamblu. Extracțiile la cald se fac în dispozitive de încălzire cu reflux (aparat S o x h l e t sau K u m a g a w a) cu toate precauțiunile ce le impune un solvent foarte inflamabil. Solventul este schimbat după 3, 6 și 12 ore de acțiune. Piesa se readuce la apă prin trecerea succesivă prin amestecurile de apă și etanol cu o concentrație descrescîndă de alcool. Piesa se va secționa la gheață. Structurile se colorează cu negru Sudan B. Se va monta în mediu miscibil cu apa.

În general, tehnicile de extragere diferențiată aplicate în histochimie nu sînt deosebit de fidele, nerespectînd pe de o parte conservarea citologică a țesutului, iar pe de altă parte se produc deplasări în substanțele grase în citografia tisulară.

C. METODE DE IDENTIFICARE HISTOCHIMICĂ A ANUMITOR LIPIDE

Identificarea naturii lipidelor din diferitele incluziuni lipidice este o problemă foarte dificilă, deoarece adesea se află asociate, în aceeași structură, lipide

Scanned with OKEN Scanner

cu proprietăţi fizice şi chimice diferite. Identificarea lor se bazează tocmai pe unele din aceste proprietăţi ca: anizotropia optică, evidenţierea caracterului acid, a caracterului nesaturat, evidenţierea anumitor grupări sau radicali (carbonil, sterol), evidenţierea componentei glucidice etc.

1. ANIZOTROPIA OPTICĂ

În stare solidă toate lipidele prezintă o birefringenţă de tip cristalin, în timp ce în stare lichidă, gliceridele şi acizii graşi nu sînt niciodată birefringenţi; colesterolul, fosfolipidele şi sfingolipidele în stare lichidă şi la o temperatură anumită (între punctul de topire şi punctul-zis de clarificare) sub formă de sferocristale birefringente care dă **fenomenul crucii de Malta.**

Tehnica de lucru constă în a examina o piesă proaspătă, nefixată, montată în glicerină şi examinată la microscopul polarizant. Vom putea întîlni 3 situaţii:

a) LIPIDE (A CĂROR PREZENŢĂ PE SECŢIUNE E VERIFICATĂ PRINTR-O COLORAŢIE CU UN LIZOCROM PE O SECŢIUNE MARTOR) CARE APAR IZOTROPE ŞI NU SE ILUMINEAZĂ ÎNTRE POLAROIZII ÎNCRUCIŞAŢI. Acest fapt nu ne permite nici o concluzie, pentru că gliceridele şi acizii graşi nu sînt niciodată birefringenţi în stare lichefiată. Colesterolii, fosfolipidele şi sfingolipidele pot fi izotrope, fie pentru că temperatura este superioară punctului de clarificare, fie pentru că alţi factori fizici inhibă formarea de sferocristale. Dacă lama este răcită progresiv şi urmărim modificările ce apar, se va putea constata apariţia unei birefringenţe cristaline, cu patru poziţii extincţie şi fără apariţia crucii de Mal-

Scanned with OKEN Scanner

ta. Această schimbare este comună tuturor lipidelor, deci fără valoare de identificare. Dacă sferocristalele dau fenomenul crucii de Malta, aceasta ar pleda pentru prezența colesteridelor, fosfolipidelor sau sfingolipidelor.

b) LIPIDELE CARE PREZINTĂ O BIREFRINGENȚĂ DE TIP CRISTALIN. cu patru poziții de extincție la o rotație a măsuței microscopului de 360°, vor fi supuse la o încălzire progresivă, fapt ce va face ca gliceridele și acizii grași să treacă direct de la birefringență cristalină în stare izotropă, în timp ce colesteridele, fosfo- și sfingolipidele trec în stadiul de sferocristale, formînd crucea de Malta.

c) LIPIDELE SÎNT ILUMINATE ÎN LUMINĂ POLARIZATĂ ȘI PREZINZĂ CRUCEA DE MALTA. Aceasta pledează pentru colesteride, fosfo- și sfingolipide în stadiu de sferocristale și exclude prezența gliceridelor și acizilor grași. Această birefringență dispare pasiv prin încălzirea lamei.

2. EVIDENȚIEREA CARACTERULUI ACID

Caracterul acid al incluziunilor lipidice demonstrează prezența acizilor grași liberi, în special a acidului oleic, a fosfo- și sfingolipidelor sau a cromolipoizilor.

METODA CU ALBASTRU DE NIL. VARIANTA CAIN. **Tehnica:** 1. piese fixate in formol-calciu, cu sau fără postcromizare, se vor secționa la gheață; 2. o secțiune se va trata cu negru de Sudan B pentru a pune în evidență lipidele în ansamblu; 3. o secțiune din apropierea celei precedente se supune extragerii cu piridină (o oră la 60°C) pentru dizolvarea lipidelor în ansamblu, se readuce în apă și se tratează cu ne-

Scanned with OKEN Scanner

gru de Sudan B, pentru a verifica structurile lipidice colorate în prima secţiune; 4. o a treia secţiune se va trata timp de 5 min. la 60°C cu o sol. apoasă 1% de albastru de Nil; 5. se spală rapid în apă dist. încălzită la 60°C; 6. secţiunea se pune pentru 30 sec. în ac. acetic sol. 1% încălzită la 60°C; 7. se spală în apă, se montează în mediu miscibil cu apa; 8. o a patra secţiune se tratează cu o sol. 1% de albastru de Nil timp de 5 min. apoi cu o sol. 0,02% din acelaşi colorant timp de 5 min. la 60°C, apoi se procedează ca la punctele 6 şi 7. **Rezultat:** lipidele acide apar în albastru, iar cele neutre în roz; vom compara cu secţiunile colorate cu negru de Sudan B (cu şi fără extragere cu ajutorul piridinei) pentru a identifica lipidele; vom compara apoi secţiunea colorată cu sol. concentrată, cu cea colorată cu sol. diluată, pentru a depista cazurile cînd lipidele neutre nu sînt colorate cu roşu de Nil decît prin trecerea în sol. foarte diluată.

Varianta Menschik a coloraţiei cu albastru de Nil constă dintr-o extragere cu acetonă caldă, după colorarea cu albastru de Nil, ceea ce permite evidenţierea electivă a fosfolipidelor. **Tehnica:** 1. colorare într-o sol. saturată de albastru de Nil într-un amestec de 500 ml apă dist. şi 50 ml de acid sulfuric 0,5%, amestec ce se menţine la fierbere timp de 2 ore înainte de întrebuinţare, apoi se răceşte la 60°C şi se colorează secţiunile timp de 90 min.; 2. secţiunile se clătesc în apă dist.; 3. secţiunea se trece în acetonă încălzită la 50°C timp de 30 min.; 4. se diferenţiază în ac. acetic 5% timp de 30 min.; 5. se spală şi se tratează cu HCl 0,5% timp de 3 min.; 6. spălare şi montare. **Rezultat:** numai fosfolipidele prind o tentă albastră.

Scanned with OKEN Scanner

Reacţia lui Fischler pentru acizii graşi. **Principiu:** o sol. de acetat de cupru dă cu acizii graşi săruri cuprice. Acestea sînt apoi puse în evidenţă cu hematoxilină. **Reactivi:** a) hematoxilină: sol. I, sol. de hematoxilină 10% în alcool absolut; sol. II: sol. apoasă saturată de carbonat de litiu 10 ml; apă dist. 90 ml; se amestecă în părţi egale chiar înaintea întrebuinţării b) fericianură boraxată: borax 20 g, fericianură de potasiu 25 g, apă dist. 1000 ml. **Tehnica:** secţiunile obţinute prin congelare din ţesuturi formolate sînt aduse la apă dist.; 1. mordansarea unei secţiuni într-o sol. apoasă saturată de acetat de cupru, timp de 24 ore; 2. spălare în apă dist.; 3. colorarea cu hematoxilină litinată (sol. a) timp de 20 min.; 4. diferenţierea în fericianură boraxată (sol. b) pînă cînd hematiile îşi pierd culoarea albastră închis; 5. spălare în apă dist.; 6. montare în glicerogel. **Control:** se va face o coloraţie identică pe o secţiune supusă în prealabil la o extragere a lipidelor cu un amestec de alcool-eter în părţi egale (3 băi a cîte 8 ore fiecare). **Rezultat:** structurile colorate în albastru închis pe secţiunea din care nu s-a făcut extragerea grăsimilor şi rămase incolore pe secţiunea supusă extragerii se presupune că ar conţine acizi graşi.

Metoda Holc Zinger pentru acizii graşi. **Principiu:** o sol. de acetat de cupru dă cu acizii graşi săpunuri cuprice. Un tratament cu EDTA disodică elimină cuprul neabsorbit. Cuprul fixat pe acizii graşi este în final evidenţiat prin reacţia cu acidul rubeanic. **Reactivi:** a) acidul rubeanic: ac. rubeanic 0,1 g; alcool 100 ml; se dizolvă acidul într-o cantitate redusă de alcool uşor încălzit, apoi se completează cu restul de alcool. **Tehnica:** piese proaspete secţionate la criostat sau fixate în formol neutru 10% şi secţionate prin congelare; 1. se montea-

Scanned with OKEN Scanner

ză secțiunea pe lamă și se lasă să se usuce la aer; 2. se tratează cu o sol. apoasă 0,005% acetat de cupru timp de 3—5 ore; 3. se spală în 2 reprize timp de 10 sec. într-o sol. 0,1% EDTA disodică cu pH 7,1; 4. spălare cu apă dist. 10 min.; 5. se aduce în sol. de acid rubeanic (sol. a) timp de 30 min.; 6. se spală în alcool 70° timp de 1 min., apoi la apă; 7. se montează cu glicerogel sau se deshidratează, clarifică și se montează în balsam sau DPX. **Rezultat:** acizii grași liberi se colorează verde-negricios.

3. EVIDENȚIEREA FOSFOLIPIDELOR

REACȚIA LUI BAKER PENTRU FOSFOLIPIDE. **Principiu:** unele lipide sînt insolubile la un pretratament cu bicromat de potasiu urmat de o fixare în formol. Cromul fixat pe aceste lipide este apoi evidențiat prin formarea unui lac cu hematoxilină. **Reactivi:** a) *bicromat de calciu:* bicromat de potasiu 5 g, clorură de calciu anhidră 1 g, apă dist. 100 ml; b) *hematoxilină acidă:* se dizolvă hematoxilină cristalizată 0,5 g în apă dist 48 ml; se adaugă exact 1 ml dintr-o sol. 1% iodat de sodiu; se încălzește pînă la apariția primelor bule. Se răcește, se adaugă 1 ml ac. acetic glacial. Acest reactiv se va folosi numai în ziua preparării. c) *borax-fericianură:* fericianură de potasiu 0,25 g, tetraborat de sodiu (10 H_2O) 0,25 g, apă dist. 100 ml (se va păstra la rece și întuneric); d) sol. de gelatină: soluție apoasă de crezol 0,25%, 100 ml; gelatină 25 g; se agită gelatina timp de o oră într-o sol. de crezol, apoi se încălzește pînă la dizolvare și se filtrează caldă printr-un tifon. **Tehnica:** pentru a obține rezultate satisfăcătoare se vor respecta cu strictețe timpii indicați: 1. piese fixate în formol-calciu, 6—18 ore, apoi tre-

Scanned with OKEN Scanner

cute în bicromat-calciu (sol. a) timp de 18 ore la temp. laboratorului; 2. se trec apoi într-o altă baie de bicromat-calciu la 60°C şi se lasă să acţioneze 24 ore; 3. se spală bine în apă curentă 6 ore, apoi în apă dist.; 4. se secţionează la gheaţă (a se vedea nota 1); 5. se mordansează în bicromat de calciu la 60°C timp de 1 oră; 6. se spală bine în mai multe băi de apă dist. timp de 5 min.; 7. se trec într-o sol. de hematein㠠acidă (sol. b) la 37°C, timp de 5 ore; 8. se clătesc în apă dist.; 9. se trec în borax-fericianură (sol. c) la 37°C timp de 18 ore; 10. se spală în apă 10 min.; 11. se montează cu glicerogel. **Observaţii:** 1. se pot efectua de asemenea secţiuni prin congelare după includere în gelatină; a) după spălarea de la timpul 3 se trec într-o sol. de gelatină topită (sol. d) în etuvă la 37°C, se lasă toată noaptea; b) se solidifică gelatina în frigider, se secţionează în blocuri rectangulare şi se introduc în formol-calciu; se lasă toată noaptea; c) se spală blocul în apă curentă 30 min.; d) se secţionează prin congelare. 2. Reacţia poate fi întreruptă înaintea timpului 4, introducînd fragmentul în formol-calciu. **Rezultat:** fosfolipidele care conţin colină şi poate glicolipide sînt colorate în negru. Nucleoproteinele şi mucinele se colorează la fel. Pentru a fi specifice lipidelor citate, această reacţie trebuie să fie obligatoriu completată printr-o extragere cu piridină pe piesa fixată în lichidul Bouin slab (pag. 28).

VARIANTA LUI ELFTMANN. **Principiu:** reacţie identică cu cea a lui Baker, este precedată de o cromizare controlată care permite o includere la parafină; pe ea se poate efectua o colorare cu negru Sudan B. **Reactivi:** a) sol. tamponată de hematoxilină: ac. acetic M/5 98,5 ml; sol. apoasă de acetat de sodiu M/5, 1,5 ml; hematoxilină 0,1 g; fericianură

Scanned with OKEN Scanner

de potasiu 0,005 g (înainte de a se pune secțiunile soluția se aduce la 56°C); b) sol. negru de Sudan: se poate utiliza: o sol. de lizocrom în trietilfosfat preparat după cum urmează: 1 g negru de Sudan; 100 ml trietilfosfat de 60%; se încălzește la 100°C timp de 5 min., agitîndu-se continuu; se filtrează la cald, apoi din nou după răcire. Se filtrează din nou înaintea folosirii. Dacă se utilizează această sol. se va face colorarea după schema generală a colorărilor cu lizocromi (vezi procedeul de demascare a lipidelor), precedată și urmată de baia de 10 min. în negru de Sudan printr-o trecere într-o sol. de 60% trietilfosfat. **Tehnica:** 1. se tratează un fragment subțire de țesut proaspăt cu procedeul de cromizare; 2. se spală în apă; 3. se include obișnuit în parafină, se secționează la 8—10 microni; 4. se colorează: 1. o secțiune A într-o sol. tampon de hematoxilină (sol. a) timp de 2 ore la 56°C; 2. o secțiune B cu negru de Sudan (sol. b); 5. spălarea celor două secțiuni în apă dist.; 6. montarea: 1. secțiunea A în balsam după trecerea prin alcool absolut si xilen; 2. secțiunea B în glicerogel. **Rezultat:** fosfolipidele se colorează în negru pe secțiunile A și B. Lipidele nefosforice se colorează în negru numai pe secțiunea B. Structurile nelipidice, dar care fixează lacul cromic de hematoxilină se colorează în negru pe secțiunea A.

Metoda cu hemateină acidă-bicromat După Bourgeois și Hubbard). **Principiu:** identic cu cel al reacției Baker. **Reactivi:** a) formol-calciu: sol. apoasă de formaldehidă 10% 100 ml; clorură de Ca 1 g; b) bicromat de potasiu: preparare extemporanee: sol. apoasă 1% clorură de calciu 100 ml; bicromat de potasiu 5 g; c) hemateină acidă: se amestecă extemporan: hematoxilină 50 mg, sol. apoasă 1% pe-

Scanned with OKEN Scanner

riodat de sodiu 1 ml, apă dist. 48 ml. Amestecul se fierbe apoi se răcește și se adaugă 1 ml acid acetic glacial; d) borax-fericianură: se amestecă în părți egale sol. apoasă 0,025% borat de sodiu ($Na_2B_4O_7$); sol. apoasă 0,25% de fericianură de potasiu $K_3Fe(CN_5)$. **Tehnica:** metoda se aplică pe piese mici, proaspete, nefixate, secționate la criostat la 7—10 microni: 1. fixarea secțiunilor în formol-calciu (sol. a) timp de 1—2 ore; 2. clătire în apă dist.; 3. mordansare în sol. de bicromat de potasiu (sol. b) la 60°C timp de 12—16 ore; 4. spălare 30 min. în 10 băi succesive de apă dist.; 5. colorare într-o sol. de hemateină acidă (sol. c) proaspăt preparată la 37°C, timp de 2 ore; 6. Clătire în apă distilată; 7. Diferențiere într-un amestec borax-fericianură (sol. d) la 37°C, timp de 1—2 ore; 8. clătire în mai multe reprize de apă dist.; 9. montare în glicerină sau PVP. Controlul se face prin extracție cu piridină: se pun alte secțiuni de la criostat nefixate în piridină la 60°C timp de 2 ore; spălare în apă dist.; efectuarea colorației ca mai înainte, începînd cu timpul 3. **Observații:** după timpul 8 de la tehnica cu hemateină acidă: 1. secțiunile se pun într-o sol. de 60% trietilfosfat, timp de 2 min.; 2. colorare într-o sol. de oil red 0 de 0,5% în trietilfosfat, timp de 15 min.; 3. se trec cu grijă în sol. de 60% trietilfosfat pentru scurt timp; 4. se spală în apă dist.; 5. montare cu glicerină sau PVP. **Rezultat:** fosfolipidele cu colină (lecitine, sfingomielline) se colorează în negru. Pentru ca reacția să fie specifică, această colorație nu trebuie să se producă pe secțiunile martor supuse extragerii cu piridină. În colorația combinată cu oil red 0 lipidele neutre se colorează în roșu, iar fosfolipidele cu colină se colorează în negru.

Scanned with OKEN Scanner

Metoda cu Luxol Fast Blue după Salthouse. **Principiu:** diferenţele rezidă esenţial în întrebuinţarea solventului (alcool izopropilic) şi eşantionul de colorant de calitate superioară. **Tehnica:** piese fixate în formol calciu sau formol-clorură de calciu-bromură de cetiltrimetilamoniu, incluse şi secţionate la parafină; secţiunea deparafinată în xilen este adusă în alcool absolut (3 băi succesive): 1. colorare într-o sol. de Luxol Fast Blue G sau ARN 0,1% în izopropanol absolut, timp de 1 oră la temp. camerei; 2. clătire în mai multe băi de izopropanol absolut; 3. clarificare în xilen şi montare în DPX. **Rezultat:** anumite fosfolipide şi alte substanţe sînt colorate în albastru. Adăugarea de 2% piridină în sol. colorantă va împiedica colorarea substanţelor cu fosfolipide; rezultatele vor fi comparabile cu cele de la reacţia Baker.

Metoda cu aur-hidroxamat (după Adams, Bayliss şi Ibrahim), **Principiu:** formarea unui hidroxamat prin acţiunea clorhidratului de hidroxilamină asupra legăturilor esterice de fosfogliceride şi reducerea azotatului de argint în argint metalic, se face apoi un viraj cu clorură de aur. **Reactivi:** a) sol. de azotat de argint: sol. apoasă 0,2% de amoniac 100 ml; azotat de argint 0,1 g; sodă 0,025 g. **Tehnica:** piese fixate în formol-calciu şi secţionate prin congelare la 10—15 microni; 1. secţiunea este hidrolizată într-un amestec de sodă 12% şi de clorhidrat de hidroxilamină 5% (1 : 1 vol.) timp de 20 min.; 2. spălare în 3 băi de apă dist. a cîte 5 min. fiecare; 3. introducere într-o sol. alcalină de azotat de argint (sol. a) expusă la lumină puternică timp de 2—4 ore; 4. spălare cu apă dist. timp de 10 min.; 5. se introduce într-o sol. apoasă de ac. acetic 1% timp de 5 min.; 6. spălare în apă dist. timp de

Scanned with OKEN Scanner

10 min.; 7. trecere într-o sol. apoasă de 0,2% clorură de aur galbenă, timp de 10 min.; 8 clătire cu grijă și scurt în apă și se introduce într-o sol. apoasă 5% de hiposulfit de sodiu timp de 5 min., și spălare în apă dist. 10 min.; 9. se montează secțiunile pe lamă și se usucă bine, se deshidratează, se clarifică și se montează în balsam sau într-o rezină neutră (sau în glicerogel). **Rezultat:** fosfolipidele se colorează în roșu-purpuriu.

METODA „OTAN, MODIFICATĂ PENTRU SFINGOMIELINĂ (după Adams și Bayliss). **Principiu:** colorația prin metoda „Otan" precedată de o hidroliză alcalină care distruge legăturile esterice ale fosfolipidelor, fără efectuarea legăturii amide a sfingomielinei; aceasta rămîne deci singura colorată în roșu-oranj. **Tehnica:** piese fixate in formol-calciu și secționate prin congelare la 10—15 microni: 1. secțiunile se introduc într-o sol. apoasă de sodă 2 N la 37°C timp de 1 oră; 2. spălare în apă; 3. clătire într-o sol. apoasă 1% ac. acetic timp de 1 minut, apoi spălare în apă dist.; 4. efectuarea reacției „OTAN" (vezi reacția în pagina 335). **Rezultat:** sfingomielina se colorează în roșu-oranj.

REACȚIA METACROMATICĂ (După Feyrter. **Principiu:** fosfolipidele (și alte substanțe) sînt colorate în roz cu un amestec de acid tartric-tionină utilizată în anumite condiții tehnice. **Reactivi:** a) acid tartric-tionină: tionină (sau violet de cresil) 1 g; sol. apoasă 5% de acid tartric 100 ml. **Tehnica,** piese fixate în formol-calciu și secționate prin congelare; 1. spălare foarte atentă a secțiunii; 2. montare pe o lamă udată cu apă dist. și uscare cu hîrtie de filtru; 3. se acoperă secțiunea cu amestecul de acid tartric-tionină (sol. a), se acoperă cu o lamelă; 4. se elimină excesul de colorant din jurul lamelei

Scanned with OKEN Scanner

cu o hîrtie de filtru; 5. se lutează; 6. se lasă în repaus şi se examinează din cînd în cînd, pînă cînd se obţin culorile aşteptate. **Rezultat:** fosfolipidele şi cerebrozidele se colorează în roz-roşu (tecile de mielină se colorează intens roşu). Mucopolizaharidele acide prezintă în aceeaşi măsură o metacromazie roz sau roşie. Este necesar de a se compara cu secţiunile colorate cu lizocromi şi eventual cu alte metode pentru lipide.

REACŢIA CU ANHIDRIDA CIS-ACONITICĂ (după Bottcher şi Boelsma van Houte). **Principiu:** colina fosfolipidelor formează cu anhidrida cis-aconitică un complex de culoare violetă. Reacţia trebuie făcută pe lame şi în recipient de cuarţ. Sticla conţine substanţa care se interferează în formaţiunea complexului. Fosfolipidele trebuie să se evidenţieze prin fixarea în formol-calciu, urmată de acţiunea clorurii de cobalt şi a periodatului de sodiu. **Reactivi:** a) sol. de anhidridă cis-aconitică: înainte cu 24 ore se va prepara: anhidridă acetică 2 vol., toluen 3 vol. Imediat înaintea colorării se adaugă acestei soluţii 2,5% anhidridă-cis-aconitică. **Tehnica:** piese secţionate în stare proaspătă la criostat, secţiunile se culeg pe lame de cuarţ; 1. fixarea secţiunilor în formol-calciu timp de 2 ore, clătire în apă curentă; 2. Se tratează într-o soluţie apoasă 10% de clorură de cobalt, timp de 24 ore; 3. spălare intensă şi prelungită în apă, dar cu mare atenţie, pentru a se elimina clorura de cobalt; 4. se tratează cu o sol. apoasă 1% periodat de sodiu la 37°C timp de 1 oră; 5. se spală cu de-amănuntul; 6. deshidratare prin trecere în alcooluri cu concentraţii din ce în ce mai ridicate, iar la sfîrşit prin 2 băi de alcool absolut. Deshidratarea trebuie să fie perfectă; 7. eliminarea cu grijă a urmelor de alcool absolut, prin trece-

Scanned with OKEN Scanner

rea secțiunii prin mai multe băi de toulen; 8. clătire într-un amestec de anhidridă acetică-toluen (1 : 1 volume); 9. trecerea lamei într-un recipient de cuarț care conține anhidridă cis-aconitică (sol. a) preparată cu 24 ore înainte și se lasă aici timp de 30—60 min.; 10. eliminarea excesului de reactiv prin clătire într-un amestec de anhidridă acetică-toluen (1 : 1 volume); 11. clarificare, montare în balsam. Examinare imediată. **Rezultat:** lecitinele, lizolecitinele și sfingomielinele sînt colorate în violet.

4. EVIDENȚIEREA GRUPĂRII CARBONIL A LIPIDELOR

În principiu, se pretează la studiul prin evidențierea carbonililor lipidici trei categorii de substanțe: plasmalogenii sau acetalfosfotidele, derivații de oxidare ai lipidelor nesaturate și cetosteroizii.

Reacția plasmală. varianta hayez. **Principiu:** acțiunea scurtă a unei soluții de clorură mercurică pe secțiuni (la ghează) de țesuturi proaspete, nefixate, eliberează grupele aldehidice a acetal-fosfatidelor; acestea sînt apoi puse în evidență prin reactivul Schiff. **Reactivi:** reactivul Schiff (pag. 119); apa sulfuroasă (pag. 121). **Tehnica:** secțiuni la ghează de 10—15 microni de țesut proaspăt, nefixat, se montează pe lamă; 1. spălare în mai multe băi de apă dist.; 2. introducerea unei secțiuni într-o sol. apoasă 1% de clorură mercurică timp de 10 min.; 3. clătire rapidă în apă dist.; 4. introducerea acestei secțiuni și a unei secțiuni care n-a fost tratată cu clorură mercurică în reactivul Schiff, timp de 15 min.; 5. spălare în 3 băi succesive de apă sulfuroasă a cîte 3 min. fiecare; 6. spălare în apă; 7. montare cu glicerogel. **Rezultat:** acetal-fosfolipidele sînt colorate în roz-roșu; eventualele reacții pseudo-plasmale date de

Scanned with OKEN Scanner

oxidarea lipidelor nesaturate prin oxigenul din aer sînt eliminate prin compararea cu secţiunea nesupusă acţiunii clorurii mercurice, nu se vor considera ca acetalfosfatide decît substanţele necolorate în această secţiune martor.

Varianta Cain. **Reactivi:** a) reactivul Schiff-clorura mercurică: se amestecă în părţi egale: reactivul Schiff diluat la jumătate în apă sulfuroasă; sol. apoasă saturată de clorură mercurică (în jur de 7%). b) Apa sulfuroasă. **Tehnica:** 1. se introduce un fragment tisular într-un amestec de reactiv Schiff-clorură mercurică (sol. a) timp de 15 min.; 2. spălare în 3 băi succesive de apă sulfuroasă (sol. b) timp de 3—5 min. în fiecare; 3. tratarea fragmentului cu o sol. apoasă 10% de formol timp de 2 ore; 4. spălare în apă curentă timp de 2 ore; 5. secţionare prin congelare; 6. montare în glicerogel. **Rezultat:** acetal-fosfatidele sînt colorate în roşu-purpuriu.

5. EVIDENŢIEREA CARACTERULUI NESATURAT AL LIPIDELOR

Numeroase lipide prezintă în molecula lor legături etilenice conjugate, fapt ce permite evidenţierea lor histochimică prin reducerea acidului osmic, adiţionare de halogeni sau oxidare cu acid performic sau peracetic, urmată de tratare cu reactivul Schiff.

Metoda cu tetraoxid de osmiu (după Adams). **Principiu:** colorarea neagră a lipidelor nesaturate pe ţesuturi fixate în formol-calciu pe un timp scurt şi secţionate la congelare, prin reducerea tetraoxidului de osmiu. **Tehnica:** piesele fixate în formol-calciu şi secţionate la congelare: 1. introducerea secţiunii în stare liberă sau montată pe lamă într-o sol. apoasă 1% de tetraoxid de osmiu timp de 2—18 ore (se uti-

Scanned with OKEN Scanner

lizează un recipient ermetic închis); 2. spălare în apă curentă timp de 20 min.; 3. montare cu glicerogel. **Rezultat:** lipidele nesaturate sînt colorate în negru; lipidele saturate și colorantul liber rămîn incolore.

METODA ZISĂ „OTAN" A LUI ADAMS. **Principiu:** cuplarea colorării lipidelor nesaturate hidrofobe, în negru, prin reducerea cu tetraoxid de osmiu, cu o colorare a lipidelor nesaturate hidrofile (fosfoglicride, sfingomielina) în roșu cu alfa-naftilamină. Această ultimă colorare este o reacție de chelare între osmiul neredus fixat pe legăturile duble ale fosfolipidelor nesaturate și alfa-naftilamină. Literele OTAN reprezintă inițialele de la osmiu, tetraoxid, alfa, naftilamină. **Reactivi:** a) tetraoxid de osmiu-clorat de potasiu: sol. apoasă 1% tetraoxid de osmiu 10 ml; sol. apoasă 1% clorat de potasiu 30 ml; b) alfa-naftilamină: sol. saturată de alfa-naftilamină în apă dist. în prealabil încălzită la 40°C (se va filtra înainte de întrebuințare). **Tehnica:** piese fixate în formol-calciu și secționate prin congelare la 10—15 microni; 1. se introduc secțiunile într-un amestec de tetraoxid de osmiu-clorat de potasiu (sol. a) timp de 18 ore; recipientul utilizat trebuie să fie plin cu soluție și ermetic închis; 2. spălare în apă dist. 10 min. și montare pe lamă; 3. tratare cu o sol. apoasă saturată de alfa-naftilamină (sol. b) la 37°C timp de 10—12 min.; 4. spălare în apă dist. 5 min.; 5. supracolorare cu sol. albastru alcian 2% în ac. acetic 5% timp de 15—60 sec.; montare cu glicerogel. **Rezultat:** fosfolipidele sînt colorate în roșu-oranj, esterii colesterolului și trigliceridele sînt colorate în negru; aceste colorații negre ale fosfolipidelor nesaturate hidrofobe pot fi uneori mascate de colorația roșie a fosfolipidelor asociate; este posibil să le eliminăm printr-un tra-

Scanned with OKEN Scanner

tament în prealabil cu acetonă, tratament care lasă fosfolipidele intacte.

REACȚIA CU ACID PERFORMIC SAU PERACETIC-SCHIFF. VARIANTA LILLIE. **Principiu:** oxidarea dublelor legături ale lipidelor nesaturate cu ajutorul ac. performic sau peracetic, efectuate pe secțiuni la gheață a țesuturilor fixate în formol, aduse în stare de peroxizi apoi aldehide, acestea, sînt apoi evidențiate prin reactivul Schiff. **Reactivi:** 1. gelatina cromică: sol. 1% gelatină în apă dist.; 0,05% alaun de crom și potasiu; 2. acid performic: sol. apoasă 90% acid formic 8 ml; peroxid de hidrogen (apă oxigenată 30%) 31 ml, acid sulfuric conc. (d=1,83) 0,22 ml.; se utilizează după 2 ore (atunci se formează 4,7% acid performic); 3. acid peracetic: sol. 40% gata preparată care se găsește în comerț sau: acid acetic glacial 95,6 ml; apă oxigenată 30% 259 ml; acid sulfuric conc. (d=1,83) 2,2 ml; se astupă 3 zile apoi se adaugă pentru slăbirea ei: fosfat disodic 40 mg (această sol. se conservă mai multe luni în frigider); 4. reactiv Schiff; 5. apă sulfuroasă; 6. apă de brom: amestec extemporan de brom 1 ml, apă dist. 39 ml. **Tehnica:** piese fixate în formol-calciu și secționate prin congelare. Adams recomandă montarea secțiunilor pe lame date cu gelatină cromică (sol. 1) și uscare la aer; 1. se tratează cu sol. 2 timp de 90 min. sau cu sol. 3 timp de 2 ore; 2. spălare în apă curentă timp de 10 min.; 3. colorare cu reactivul Schiff (sol. 4) timp de 10 min.; 4. spălare în trei băi din sol. 5, timp de 3 minute pentru fiecare; 5. spălare 10 min. în apă curentă; 6. montare în glicerogel. **Rezultat:** lipidele nesaturate sînt colorate în roșu. Lillie recomandă controlul reacțiilor pozitive printr-un blocaj cu apă de brom; 1. se montează o secțiune martor pe o lamă, se scurge și se

Scanned with OKEN Scanner

lasă să se usuce la aer, timp de 10—15 min.; 2. se introduce în apă de brom proaspăt preparată (sol. 6) timp de 1—6 ore; 3. spălare în apă; 4. tratare cu o sol. apoasă 0,5% metabisulfit de sodiu timp de 1—2 min.; 5. spălare în apă curentă; 6. efectuarea reacției cu peracid Schiff după indicațiile de mai sus. Bromul se fixează la nivelul dublei legături a lipidelor nesaturate, reacția Schiff trebuie să fie negativă.

Reacția Gyergyai și Gyergyai-Malatinszky· **Principiu:** punerea în evidență a lipidelor nesaturate, prin fixarea unui reactiv halogenat (brom-clor) pe duble legături, apoi transformarea în halogenuri de argint prin acțiunea unei soluții de azotat de argint; halogenura de argint în final este redusă de către un revelator fotografic. **Reactivi:** 1. sol. de bromat-bromură de potasiu: 2,78 g bromat de potasiu, 3,96 g bromură de potasiu, apă dist. ad. 1000 ml; în momentul folosirii se diluează 2 ml din această sol. în 18 ml apă dist. Se obține astfel o sol. 0,01 N pe care o introducem într-un balon Würtz cu capacitate de 50 ml în care se introduc 10 ml acid clorhidric 20%, se cuplează tubul lateral al balonului Würtz la o trombă de apă, acidul clorhidric se va introduce picătură cu picătură în sol. de bromat-bromură de potasiu; 2. revelator fotografic: se recomandă revelatorul Agfa 100. **Tehnica:** piese fixate în formol-calciu și secționate prin congelare la 5—10 microni; 1. spălarea secțiunilor în apă dist.; 2. introducerea secțiunii într-un balon Würtz care conține sol. bromat-bromură de potasiu (sol. 1). Pe gura balonului Würtz se aplică o pîlnie de separare de o capacitate de 50 ml; se face vidul și se lasă să pătrundă o sol. 20% HCl. După 5 minute se deschide robinetul de separare și se lasă să circule aerul

Scanned with OKEN Scanner

în sistem; se va plasa astfel tubul ca pîlnia să pătrundă în lichid; agitarea continuă a secțiunilor este asigurată prin trecerea bulelor de aer; după 5 min. se demontează aparatul; 3. se spală în mai multe reprize de apă dist. pentru a elimina excesul de brom și clor, în total 30 min.; 4. se scufundă secțiunea într-o sol. apoasă 2% nitrat de argint 10 min.; 5. se spală în mai multe băi de apă dist., în total 20—30 min.; 6. se introduce în revelatorul Agfa 100 10 min.; 7. spălare în apă dist.; 8. montarea secțiunii pe lamă, dehidratare în alcool, clarificare în xilol, montare în balsam. **Rezultat:** lipidele nesaturate sînt colorate în negru.

Metoda cu bromură de argint (după Norton și col.). **Principiu:** identic cu cel al reacției precedente. **Reactivi:** 1. sol. de brom: sol. apoasă 2% bromură de potasiu 195 ml, brom 0,5 ml; 2. acid performic: la 8 ml acid formic 90% se adaugă 31 ml apă oxigenată 30% și 0,22 ml acid sulfuric conc. Se încălzește la 25°C sau la o temperatură ușor inferioară; în jur de 2 ore se formează 4,7% acid performic și sol. devine improprie după cîteva ore. **Tehnica:** 1. se fixează fragmente mici (maximum 3 mm) timp de o noapte sau chiar mai mult în sol. 10% de formaldehidă care conține 1% clorură de calciu, 1% clorură de cadmiu și carbonat de calciu în exces, apoi se spală fragmentul în apă curentă; se secționează prin congelare la 10 microni, se spală cu atenție în apă dist.; 2. se scufundă secțiunea în sol. de lucru timp de 1 min.; 3. se spală bine cu apă dist.; 4. se spală în sol. apoasă 1% bisulfit de sodiu; 5. se spală cu multă grijă în mai multe băi de apă dist. (autorii precizează 7 băi); 6. se lasă toată noaptea în sol. de nitrat de argint 1% în acid azotic 1 N; 7. se spală bine de 7 ori în apă dist.; 8. se reduce

Scanned with OKEN Scanner

într-un revelator foto; 9. se spală bine în apă; 10. se montează cu glicerogel. **Rezultat:** lipidele nesaturate se colorează în negru sub rezerva următoarelor controale: 1. suprimarea bromizării, se înlocuiește timpul 2, sol. apoasă de brom printr-o sol. de bromură de potasiu 2%; 2. blocarea dublelor legături: înainte de timpul 2 se tratează secțiunea printr-o sol. de acid performic timp de 30 min., se spală de mai multe ori în apă distilată, apoi se face reacția; 3. extragerea lipidelor: înaintea timpului 2 se face extragerea după cum urmează: a) se spală secțiunea în mai multe băi de metanol; b) se pune secțiunea într-un amestec de cloroform (2 părți) și metanol (1 parte) timp de 2 ore; c) se spală de 2 ori în metanol; d) se spală de 2 ori în apă dist.; 4. solubilizarea bromurii de argint: între timpii 7—8 se introduce secțiunea într-o sol. apoasă 1% cianură de potasiu (sau hiposulfit de sodiu 0,1 N) timp de 15 minute.

6. EVIDENȚIEREA COMPONENȚILOR GLUCIDICI AI LIPIDELOR

Tehnica PAS (după Adams și Bayliss). **Principiu:** reacția PAS pune în evidență fracțiunea glucidică a glicolipidelor. Grupele aminate, alchilaminate, legăturile etilenice și fosfoinositice care ar putea interfera sînt eliminate sau blocate în prealabil prin acțiunea diferiților reactivi. **Reactivi:** a) acid performic: sol. apoasă 98% de acid formic 45 ml la care se adaugă: peroxid de hidrogen (apă oxigenată 30%) 4,5 ml acid sulfuric conc. (d=1,83) 0,5 ml; se lasă să se învechească timp de 1 oră sau mai puțin, se agită bine cu o baghetă de sticlă înainte de întrebuințare; această sol. rămîne tc-tivă timp de 24 ore. b) cloroform-metanol: cloro-

Scanned with OKEN Scanner

form (2 volume), metanol (1 volum). **Tehnica:** piesele fixate în formol-calciu, secţionate prin congelare şi montare pe lame care în prealabil au fost înmuiate în gelatină cromică (vezi reacţia cu acid performic-Schiff varianta Lillie): 1. secţiunea se tratează cu hidroxid de sodiu 2 N la 37°C timp de 1 oră; 2. se spală bine în apă şi se clătește secţiunea într-o sol. apoasă 1% acid acetic; 3. se tratează cu o sol. apoasă 10% de cloramină T la 37°C timp de 1 oră; 4. se spală rapid într-un volum mare de apă (atenţie la piesă că se dezlipeşte); 5. oxidarea în acid performic (sol. a) timp de 10 min.; 6. spălare în apă; 7. tratare cu dinitro-2,4 fenilhidrazină saturată în HCl la 4°C timp de 2 ore; 8. spălare cu grijă în apă timp de 10 min.; 9. reacţia PAS, se omite însă clătirea în final cu apă sulfuroasă şi se montează cu glicerogel. Secţiunile martor sînt supuse la aceeaşi reacţie după un tratament prealabil în cloroform-metanol (sol. b) la 20—25°C timp de cel puţin 2 ore şi nu mai mult de 18 ore. **Rezultat:** dacă substanţa este colorată cu PAS după acţiunea diferitelor tratamente de la timpii 1—7 este vorba de un polizaharid sau de o glicolipidă (cerebrozidă sau gangliozidă legată de proteină) diferenţa între polizaharide şi glicolipide se face prin acţiunea amestecului de cloroform-metanol, numai glicolipidele singure sînt extrase prin acest solvent.

Reacţia Molisch, (modificată de Diezel pentru glicolipide). **Principiu:** reacţia colorează fracţiunea glucidică a glicolipidelor prin acţiunea unui amestec de alfa-naftol şi acid sulfuric. Valoarea acestei reacţii în histochimie este pusă la îndoială de Adams. **Reactivi:** a) amestec de alfa-naftol — acid sulfuric: sol. de alfanaftol 5% în alcool 95°, 0,5 ml; acid sulfuric 2 N, 10 ml. **Tehnica:** piesele

Scanned with OKEN Scanner

fixate în formol neutru 10% sînt secţionate la parafină sau prin congelare; în primul caz secţiunile se deparafinează şi se duc la apă; în al doilea caz secţiunile se montează pe lamă şi se lasă să se usuce la aer; 1. se pun pe preparat 2—3 picături de amestec alfanaftol-acid sulfuric (sol. a), se introduce în etuvă la 90—100°C timp de 5—10 min.; 2. se scoate preparatul, se acoperă cu o lamelă şi se examinează imediat. **Rezultat:** glicolipidele se colorează în roşu-violaceu (această coloraţie se degradează în timp de 1 oră).

Reacţia lui Brückner modificată de Diezel pentru glicolipide. **Principiu:** reacţia colorează fracţiunile glucidice ale glicolipidelor cu un amestec de orcinol (dihidroxi-3,5 toluen)-acid sulfuric; valoarea acestei reacţii în histochimie este pusă la îndoială de Adams. **Reactivi:** a) amestec orcinol-acid sulfuric; sol. apoasă 2% de orcinol 1 ml; acid sulfuric 2 N 10 ml. **Tehnica:** piesele fixate şi secţionate ca pentru metoda anterioară sînt montate pe lamă şi uscate; 1. se pun pe preparat 2—3 picături de amestec orcinol-acid sulfuric (sol. a); se introduc în etuvă la 90—100°C timp de 5—10 min.; 2. se scoate preparatul, se acoperă cu o lamelă şi se examinează. **Rezultat:** glicolipidele sînt colorate în roşu pînă la roşu-albăstrui.

7. EVIDENŢIEREA ALTOR TIPURI DE LIPIDE

Coloraţia cu violet de cresil pentru sulfatide. Metoda lui Hirsch şi Peiffer. **Principiu:** violetul de cresil în sol. acid acetic colorează metacromatic în brun în mod sigur anumite sulfatide. **Tehnica:** piesele fixate în formol-calciu sînt secţionate prin congelare; 1. se colorează într-o sol. de violet de cresil

Scanned with OKEN Scanner

0,02—0,1% în acid acetic 1% timp de 10—30 min.; 2. se spală bine în apă; 3. se montează în glicerogel. **Rezultat:** unele sulfatide (ca de exemplu cele ale leucodistrofiei metacromatice) sînt colorate în brun; mielina se colorează ortocromatic ca alte țesuturi, într-o tentă liliachie sau violetă.

PROCEDEUL LUI ADAMS, ABDULLA, BAYLEISS ȘI WELLER PENTRU TRIGLICERIDE. **Principiu:** metoda se bazează pe o hidroliză enzimatică a trigliceridelor printr-o lipază și punerea în evidență a acizilor grași care provin din această hidroliză prin formarea de săpun calcic, apoi vizualizarea acestui săpun prin schimbarea în sulfură de plumb insolubilă, care se colorează în negru. **Reactivi:** a) sol. de lipază: lipază de origine pancreatică 50 ml; sol. apoasă 2% clorură de calciu 10 ml; tampon Tris 0,2 M pH 8,0 15 ml; apă dist. 25 ml; b) sol. diluată de sulfură de amoniu: sol. 20% sulfură de amoniu 1 ml; apă dist. 60 ml. **Tehnica:** piese fixate în formol-acetat de calciu timp de 18 ore sau mai puțin sînt secționate prin congelare; reacția poate fi executată prin secțiuni libere sau după montarea secțiunilor pe lame înmuiate în gelatină cromică; 1. incubarea preparatului în sol. de lipază (sol. a) timp de 4 ore (se poate prelungi acest timp pînă la 18 ore); 2. spălare intensă în apă dist.; 3. tratarea cu o sol. apoasă 1% de azotat de plumb timp de 15 min.; 4. spălare în apă dist.; 5. introducerea preparatului într-o sol. diluată de sulfură de amoniu (sol. b) timp de 1 min.; 6. spălare în apă dist.; 7. colorarea nucleilor cu hemalaun, spălare și trecere în carbonat de litiu, apoi spălare în apă; 8. montare în glicerogel. **Control:** pentru eliminarea eventualelor depozite de calciu susceptibile de a da reacții fals-pozitive, secțiunea

Scanned with OKEN Scanner

se trece în prealabil într-o sol. apoasă 20% de acid etilen-diamină tetracetică (EDTA) cu pH 6,9 timp de 30 min. **Rezultat:** trigliceridele se colorează în negru.

METODELE LUI BERENBAUM PENTRU LIPIDE MASCATE. **Principiu:** colorarea lipidelor mascate cu negru de Sudan după acţiunea demascantă a unei spălări prelungite în apă şi utilizarea de solvent specific colorantului (acetonă) sau artificii de tehnică (reacţia efectuată la cald), pentru a creşte penetrabilitatea negrului de Sudan în aceste lipide; cele 3 procedee indicate pun în evidenţă diferite varietăţi de lipide mascate, există deci interesul de a le utiliza pe toate trei. **Tehnica:** piesele fixate în alcool, formol, Carnoy, Zenker sau alţi fixatori uzuali, incluse şi secţionate la parafină; secţiunile se deparafinează şi se duc la apă; A. negru de Sudan în sol. de acetonă: 1. spălare în apă curentă timp de 2—48 ore (o spălare timp de o noapte în general dă rezultate satisfăcătoare); 2. clătire în acetonă; 3. introducerea într-o sol. saturată (în jur de 2%) de negru de Sudan B în acetonă, la 37—60°C, timp de 1—48 ore (un timp mediu de 4 ore este în general satisfăcător); 4. spălare în xilen pînă cînd nici un nor de colorant nu iese din preparat, aceasta necesită aprox. 10 min; 5. montare în balsam; B. negru de Sudan încălzit: 1. spălare în apă curentă 2—48 ore ca la metoda precedentă; 2. clătire în alcool de 70°; 3. aşezarea preparatului orizontal pe un suport, se acoperă cu o sol. proaspăt filtrată de negru de Sudan B saturat în alcool 70°; se pune pe foc şi se lasă să ardă, se elimină reziduul şi fără a se lăsa să se usuce secţiunea se acoperă din nou cu sol. de negru de Sudan B, se arde din nou şi se repetă această operaţie

Scanned with OKEN Scanner

de 6—12 ori (în general de 6 ori este suficient); 4. se spală în alcool absolut pînă ce nu mai iese colorant; 5. se clarifică în xilol și se montează în balsam; C. negru de Sudan în sol. alcoolică de 60°: 1. se spală în apă curentă timp de 2—48 ore ca în metodele precedente; 2. clătire în alcool 70°; 3. introducerea în sol. saturată de negru de Sudan în alcool 70° la temperatura de 60°C timp de 4 ore (acest timp este prelungit la nevoie); 4. clătire în alcool de 70°; 5. introducerea în alcool absolut 10 min.; 6. clarificare, montare în balsam. **Rezultat:** lipidele mascate sînt colorate în negru-cenușiu; specificitatea acestei metode pentru lipide poate fi verificată efectuînd colorația pe o secțiune martor, care în prealabil a fost supusă unei extrageri cu metanol-cloroform pe timp de 3—7 zile.

8. REACȚII PENTRU STEROLI ȘI STEROIZI (COLESTEROLI ȘI COLESTERIDE)

Metoda lui Schultz și variantele ei. **Principiu:** după un tratament cu alaun de fier, destinat a oxida colesterolul în hidroxi-7-colesterol, aceasta este pusă în evidență prin acțiunea unui amestec de anhidridă acetică și acid sulfuric care dă un complex de culoare verde (reacția lui Lifschutz). **Reactivi:** a) amestec de acid sulfuric—acid acetic: se pune într-un tub introdus în apă înghețată 2—5 ml ac. acetic glacial, la care se adaugă încet, cu precauțiune, un volum egal de acid sulfuric conc. pur; reactivul se va utiliza imediat; b) alaun de fier tamponat: alaun de fier și amoniu (fero-amoniacal) 2,5 g; tampon acetat 0,2 M pH 3, 100 ml; **Tehnica:** piesele fixate în formol neutru sau formol-calciu sînt secționate prin congelare la 10—15 microni;

Scanned with OKEN Scanner

1. **Procedeul original al lui Schultz:** 1. se pune secţiunea într-o sol. apoasă 2,5% alaun de fier la 37°C timp de 3 zile; 2. se introduce în apă dist., se montează pe apă şi se absoarbe excesul cu o hîrtie de filtru; 3. se pun pe suprafaţa piesei cîteva picături de amestec acid sulfuric, acid acetic (sol. a) şi se acoperă cu o lamelă; 4. examinarea imediată a preparatului.

Varianta Hershberger. 1. se introduce secţiunea în apă oxigenată 3% sau într-o sol. apoasă 1% iodat de sodiu 1—3 min.; 2, 3 şi 4 ca mai sus.

Varianta Weber şi col. Secţiunea adusă la apă dist. este facultativ spălată în mai multe băi de apă dist. timp de 24 ore; 1. se tratează într-o sol. de alaun de fier în tampon (sol. b) la 37°C timp de 7 zile (autorii indică timp mai scurt, 1—3 zile, eventual la temperatura laboratorului); 2. spălare în 3 băi succesive de tampon acetat timp de 1 oră; 3. clătire în apă dist.; 4. se trece într-o sol. apoasă 5% de formaldehidă timp de 10 min.; 5. montarea piesei; uscare cu atenţie cu hîrtie de filtru pentru a îndepărta excesul de formaldehidă, dar fără a lăsa să se usuce; 6. se acoperă secţiunea cu cîteva picături din amestecul acid sulfuric—acid acetic (sol. a); se acoperă cu o lamelă pe care o apăsăm uşor pentru ca secţiunea să se impregneze bine cu amestecul; 7. examinarea imediată a preparatului. **Rezultat:** colesterolul şi esterii săi sînt mai întîi coloraţi în albastru-violet, apoi virează spre verde, singura culoare specifică; această culoare nu persistă mult timp, trecînd peste 30 min. în tentă brună; este deci necesar de a examina preparatul imediat după ce reactivul a fost plasat pe secţiune.

Scanned with OKEN Scanner

Reacția cu digitonină, a lui Leulier și Revol. **Principiu:** colesterolul și toți hidroxi-3 beta sterolii neesterificați puși în prezența unei sol. de digitonină sau alcool formează un complex cristalin birefringent insolubil în apă. **Reactivi:** a) digitonina: alcool 35% 100 ml; digitonină 0,5 g. **Tehnica:** piesele fixate în formol-calciu sînt secționate prin congelare și secțiunile sînt aduse la apă dist.: 1. secțiunea se tratează cu sol. de digitonină 2—3 ore; se clătește în etanol 35%; 3. se montează cu glicerină și se examinează la lumină polarizată. **Rezultat:** colesterolul și hidroxi-3 beta steroli: ace birefringente adesea dispuse în rozete; colesterolii sînt la fel, birefringenți.

Reacția cu digitonină – Oil Red O, după Leulier și Revol (varianta Lison): **Principiu:** reacție destinată pentru a separa digitoninele birefringente ale colesterolului (în hidroxi-3 beta sterol). Esterii colesterolului de asemenea birefrigenți (dar neformînd ace și rozete caracteristice digitoninelor); reacția digitoninei este cuplată cu o colorare cu un lizocrom, colesteridele singure se colorează cu lizocrom și își pierd birefringența; colesterolul și hidroxi 3-beta sterolii neesterificați rămîn singurii birefringenți. **Reactivi:** a) digitonina: alcool 50% 100 ml; digitonină 0,5 g; b) Oil Red O (vezi procedeul de demascare al lipidelor, pag. 319). **Tehnica:** Piesele fixate în formol-calciu sînt secționate prin congelare, iar secțiunile sînt aduse la apă dist.; 1. secțiunile se tratează într-o sol. de digitonină (sol. a) timp de 3 ore; 2. clătire în alcool 50%; 3. clătire în apă dist.; 4. secțiunea se trece în alcool izopropilic 60% proaspăt preparat, timp de 1 min.; 5. colorare cu Oil Red O (sol. b) proaspăt filtrat timp de 10 min.; 6. diferențiere rapidă (30 sec.) în

Scanned with OKEN Scanner

alcool izopropilic 60% proaspăt preparat; 7. spălare în apă; 8. colorarea nucleilor cu hemalaun, virare, clătire în apă; 9. montare în siropul lui Apathy sau glicerogel. **Rezultat:** colesterolul şi hidroxi 3-beta sterolii neesterificaţi sînt sub formă de ace birefringente, adesea dispuse în rozetă.

Reacţia Feigin. **Principiu:** metoda lui Feigin constă în a efectua mai întîi o reacţie a digitoninei, apoi o extragere cu alcool-eter; în final o reacţie a lui Schultz, complexul colesterol-digitonină fiind insolubil în alcool-eter se colorează cu reactivul Schiff; din contră, colesteridele sînt extrase prin solvent, necolorîndu-se. **Reactivi:** a) digitonină: alcool 40% 100 ml; digitonină 0,5 g; b) amestec acid sulfuric—acid acetic (vezi reacţia Schulze, pag. 344). **Tehnica:** piesele fixate în formol-calciu sînt secţionate prin congelare şi aduse la apă dist.; 1. se tratează două secţiuni cu o sol. de digitonină (sol. a) timp de 3 ore; 2. se usucă şi se introduce o secţiune (A) într-un amestec de părţi egale alcool absolut şi eter, timp de 3 ore; 3. se usucă şi se introduce secţiunea A precum şi secţiunea martor (B) care nu este supusă extragerii, într-o sol. apoasă 2,5% alaun de fier la 37°C, timp de 2—4 zile; 4. se usucă cu grijă cu o hîrtie de filtru, dar fără a se lăsa să se usuce şi se acoperă secţiunile cu cîteva picături dintr-un amestec acid sulfuric—acid acetic. (sol. b) executîndu-se ca în reacţia Weber; 5. se examinează preparatul imediat. **Rezultat:** complexul colesterol-digitonină se colorează în verde pe secţiunea supusă extracţiei (A) sau nu. Esterii colesterolului sînt de asemenea coloraţi în verde pe secţiunea martor (B) dar nu se colorează pe secţiunea supusă extracţiei (A). Coloraţia verde observată pe secţiunea A este deci specifică colesterolului.

Scanned with OKEN Scanner

Reacția lui Grundland, Bulliard și Maillet. **Principiu:** fragmente tisulare sînt fixate în alcool saturat cu digitonină; apoi sînt tratate cu o sol. de triclorură de bismut în nitrobenzen. Se va dezvolta o coloraţie brună care, după autori, este specifică colesterolului. **Reactivi:** reactivul lui Grundland: triclorură de bismut 0,2 g; clorură de acetil 1 ml; nitrobenzen anhidru 100 ml; b) amestec alcool-acid azotic: acid azotic conc. (d = 1,38) 30 ml; alcool absolut 10 ml. **Tehnica:** se fixează fragmente mici tisulare în alcool 70% saturat cu digitonină; 2. se lasă alcoolul să se evaporeze şi apoi fragmentele se introduc în parafină topită care conţine 5% monostearat de glicerogel, timp de 12 ore, se includ în parafină, se secţionează la 6—10 microni şi se montează pe lamă; reacţia se efectuează fără scoaterea parafinei; 3. introducerea în reactivul de triclorură de bismut timp de 15—45 min.; 4. se clătește rapid într-o sol. de clorură de acetil 10% în nitrobenzen; 5. se spală într-un amestec de alcool-acid azotic (sol. b), pentru a îndepărta excesul de bismut; 6. se introduce rapid în alcool absolut; 7. se introduce într-o sol. diluată 1/10 de sulfură galbenă de amoniu pentru a accentua culoarea; 8. spălare în alcool absolut; 9. clarificare, montare în balsam. **Rezultat:** colesterolul se colorează brun.

9. EVIDENŢIEREA GRUPELOR CARBONIL ALE CETOSTEROIZILOR

Reacția Bennett. **Principiu:** condensarea fenilhidrazinei cu substanţele care posedă o grupare carbonil formînd un complex de culoare galbenă. **Reactivi:** a) fenilhidrazină (se prepară doar înaintea folosirii): sol. apoasă 2% de clorhidrat de fenil hi-

Scanned with OKEN Scanner

drazină 50 ml; tampon acetat 0,1 M pH 6, 50 ml; se introduce într-un recipient complet plin şi bine închis. Bark şi Anderson preconizează o soluţie apoasă 20% ac. acetic saturat cu fenilhidrazină. **Tehnica:** reacţia poate fi efectuată direct sau după un pretratament susceptibil de a provoca apariţia grupelor carbonil; în primul caz piesa este fixată în formol-calciu sau formol neutru şi secţionată la congelare la 10 microni, apoi adusă la apă; 1. piesa se introduce într-o sol. de fenilhidrazină (sol. a) timp de 3—12 ore; 2. spălare în apă dist.; 3. montare în glicerogel. Examinarea se face utilizînd un filtru albastru sau verde pentru creşterea contrastului sau la lumină oblică. **Rezultat:** grupele carbonil se colorează în galben (culoare slabă).

Reacţia lui Khanolkar, modificată de Romer. **Principiu:** reacţia se bazează pe oxidaţia alfacetolilor în cetoaldehide cu ajutorul clorurii ferice, urmată de vizualizarea grupărilor aldehidice prin reactivul Schiff. **Reactivi:** reactiv Schiff şi apă sulfuroasă. **Tehnica:** piesele fixate în formol neutru 10% la 0—4°C timp de 3 ore, apoi secţionate prin congelare la 15 microni; 1. spălare în apă dist. la 4°C; 2. blocarea eventualelor aldehide preexistente prin acţiunea unei sol. de anilină 0,3% în ac. acetic 0,5% la 37°C timp de 1—1,5 ore; 3. introducerea în trei băi succesive de sol. de acid acetic 0,5% timp de 3—5 min. fiecare; 4. spălare intensă în mai multe băi de apă dist. la 4°C timp de o oră; 5. oxidare într-o sol. 5% de clorură ferică la 57°C timp de 30 min.; 6. spălare în 3 băi succsesive în apă dist. timp de 3—5 min. fiecare; 7. introducerea în reactivul Schiff timp de 30 min.; 8. se introduce în trei

Scanned with OKEN Scanner

băi succesive de apă sulfuroasă a 3 min. fiecare; 9. spălare în apă, montare cu glicerogel. **Rezultat:** corticosteroizii sînt coloraţi în roşu.

Metoda fluorescenţei pentru cetosteroide (după Stoward şi Smith). **Principiu:** metoda se bazează pe transformarea grupelor carbonil a cetosteroidelor în metilhidrazone prin acţiunea sulfatului de metil hidrazină. Un tratament cu sulfobenzaldehidă permite eliminarea grupelor aldehidice. Secţiunile care nu conţin grupe cetonice de cetosteroide sînt tratate cu o sol. de salicil-oilhidrazină care le conferă o fluorescenţă galbenă-verzuie. **Tehnica:** 1. piese proaspăt fixate timp de 12 ore în formol neutru 10% la 5°C (se poate adăuga puţină hidrochinonă pentru a diminua autooxidarea lipidelor tisulare); 2. spălare în apă curentă 10 min.; dacă ţesutul este sfărîmicios se va include în Carbowax; 3. secţionare prin congelare la 5—10 microni şi montare pe lame muiate într-o sol. de gelatină 1%; 4. uscare pe o platină încălzitoare timp de cîteva minute, apoi 12 ore într-o etuvă la 37°C; 5. introducerea pentru 15—16 ore într-o sol. apoasă 1% sulfat de metilhidrazină proaspătă, iar pH sol. trebuie adus între 4—6 cu o sol. de sodă; 6. spălare într-o sol. de acid acetic 1%, apoi în două băi de apă dist. cîte un minut în fiecare; 7. se introduce într-o sol. apoasă 5% sulfobenzaldehidă timp de 2 ore; 8. tratare cu o sol. de saliciloilhidrazidă 0,5% în acid acetic 5% timp de 20 min.; 9. clătire în apă; 10. spălare într-o sol. 1% de pentacianoaminoferoat de sodiu 1%; 11. clătire în apă; 12. montare în glicerină şi examinare la microscopul cu ultraviolete. **Rezultat:** cîmpul care conţine cetosteroide are o fluorescenţă verzuie.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL X

PIGMENȚII

Din punct de vedere histologic, pigmenţii au structuri particulare foarte fine, uneori grupate în bulgări sau grămezi foarte mari, care se întîlnesc în ţesuturile normale şi/sau patologice, în celule sau în afara lor.

A. CLASIFICARE ŞI SCURTĂ CARACTERIZARE A PIGMENȚILOR

I. **Melaninele.**

II. **Pigmenţii de origine sanguină şi pigmenţii respiratori:** A. Pigmenţi de tip porfirinic (porfirina, hemoglobina, citocromul, mioglobina); B. Pigmenţi formaţi din metaloproteine neporfirinice (metaloproteine cu fier: hemosiderina, hematoproteine cu crom); C. Pigmenţi biliari (bilirubina, urobilina, stercobilina, biliverdina.

III. **Lipopigmenţi:** A. Lipopigmenţi ce conţin fier; B. Lipopigmenţi lipsiţi de fier (lipofuscina, ceride, lipocromi).

IV. **Carotenoizi.**

V. **Clorofile.**

Scanned with OKEN Scanner

VI. **Diferiţ, pigmenţi:** A. Pigmenţi de origine exogenă; B. Pigmenţi de origine endogenă.

Melaninele sînt pigmenţi de culoare închisă, de la galben la negru. Microscopic, în ţesuturi melanina apare sub formă granulară, deosebit de evidentă în formele tumorale (malano-sarcoame) şi în coroidă sau iris. Studiile de microscopie electronică sugerează originea granulelor de melanină în aparatul Golgi.

Porfirinele se întîlnesc sub formă liberă sau sub formă de grup prostetic a diverselor cromoproteine. Din punct de vedere patologic, porfirinele interesează sub aspectul perturbării metabolismului lor, dînd porfirinoze : porfirinoza congenitală, porfirinoza acută, porfirinoza cutanată tardivă sau cronică şi altele..

Hemoglobina este considerată ca un pigment, dar pe secţiuni ea nu se colorează.

Hemosiderina este un pigment din grupa metaloproteinelor cu fier. După R i c h t e r, hemosiderina este o substanţă care se găseşte sub formă de depozit, intra- sau extracelulară, fiind vizibilă la microscopul optic sub formă de granule brune, conţine fier trivalent detectabil prin reacţia Perls şi conţine cantităţi variabile de feritină, observabilă la microscopul electronic. Din punct de vedere morfologic are un aspect de granule brune foarte refringente, neregulate. Pigmentul se acumulează în ţesuturile cu aport de fier exogen în exces, sau în urma unor procese hemolitice care eliberează cantităţi mari de fier, care nu pot fi utilizate de către măduva osoasă, precum şi în unele tulburări ereditare.

PIGMENŢII BILIARI. **Bilirubina** este un pigment care dă bilei o tentă galbenă-aurie şi provine din degradarea hemoglobinei. **Urobilina** se formează prin

Scanned with OKEN Scanner

oxidarea spontană la lumină a mezobilirubinogenului și se caracterizează prin fluorescență violetă. **Stercobilina** este un pigment roșu-oranj izolat din fecale. **Biliverdina** este un pigment verde-închis, întîlnit în bila animalelor.

Lipopigmenții sau pigmenții lipidici sînt substanțe pigmentate care derivă parțial sau total din precursori lipidici. Mai mulți autori printre care și Lison și Pearse clasifică pigmenții în două grupe: lipopigmenți care conțin fier, decelabil histochimic și lipopigmenți lipsiți de fier.

Lipofuscina este un pigment granular, de culoare brună-gălbuie, rezistent la solvenții utilizați în includere la parafină, nu dă reacția Perls și are o fluorescență galbenă spre brună în lumina ultravioletă. În patologie, acest pigment a fost numit „pigment de uzură". La microscop apare ca un pigment galben-brun, uneori verzui, refringent. El este foarte fin sau sub formă de granule mari.

Ceridele se caracterizează prin insolubilitate în solvenții lipidelor, afinitate pentru coloranții grăsimilor și coloranții bazici de anilină, acidorezistență și fluorescență galbenă spre brun.

Lipocromii sînt pigmenți formați din substanțe lipidice care conțin în soluție hidrocarburi colorate din seria carotenoizilor.

B. IDENTIFICAREA HISTOCHIMICĂ A PIGMENȚILOR

În principiu, pentru identificarea unui pigment vom apela la procedee fizice (caracterele naturale ale pigmentului, solubilitatea lui, sensibilitatea sa la agenții decoloranți) și la reacții histochimice de colorare (vezi tabelele 17 și 18).

Scanned with OKEN Scanner

1. DECOLORAREA PIGMENȚILOR

Studiul decolorării pigmenților se face pè secțiunile deparafinate și hidratate, într-o soluție de agenți oxidanți, într-un timp ce variază de la cîteva minute la mai multe ore sau chiar zile. Pentru studierea unui pigment necunoscut se vor oxida mai multe secțiuni în timpi diferiți și oxidanți diferiți.

PROCEDEE OPERATIVE: secțiunile, deparafinate și hidratate pot fi tratate cu următorii reactivi:

1. **Apă oxigenată** de 30 volume (sau 10%) timp de 1—2 zile;

2. **Permanganat de potasiu:** permanganat de potasiu 0,1% timp de 12—24 ore; clătire cu apă; tratare cu acid oxalic 1% timp de 1 min.; spălare cu apă curentă.

3. **Permanganat de potasiu—acid sulfuric:** se va prepara extemporaneu: sol. de permanganat de potasiu 0,3% 1 volum; acid sulfuric 0.3% 1 volum; se introduc secțiunile în această soluție timp de 10 min. pînă la cîteva ore; se clătesc cu apă distilată; se tratează cu acid oxalic 1% pînă la dispariția culorii brune; se spală cu apă curentă timp de 30—45 min.

4. **Acid performic:** se va prepara extemporaneu: acid formic (98—100%) 23 g; apă oxigenată 90%, 28,4 g; acid sulfuric concentrat (d=1,83) 0,5 ml; în 30 minute se obține un acid performic de 35—36%, acest acid este puțin stabil și se descompune în jur de 2 ore; secțiunile se introduc în această soluție timp de 30 min. pînă la 2 ore.

5. **Acid peracetic:** se poate utiliza o sol. de concentrație slabă (8,6%) sau forte (44%); aceste soluții se pot prepara extemporaneu: a) **concentrația slabă:** se pun 0,2 ml acid sulfuric (d=1,83) peste 10 ml acid acetic glacial, apoi 25 ml apă oxigenată de 30%;

Scanned with OKEN Scanner

soluția se menține la 22°C agitînd-o; concentrația de 8,6% este atinsă la 80—90 ore; b) **concentrația forte:** se adaugă 0,11 ml de acid sulfuric (d=1,83) la 10 ml acid acetic glacial, apoi 65 ml apă oxigenată de 90%; concentrația de 44% este atinsă în 4 ore; soluțiile pot fi stabilizate cu ajutorul pirofosfatului de sodiu, în proporție de 1 : 10000; soluțiile pot fi utilizate timp de mai multe luni dacă sînt conservate la frig; albirea se realizează în 2—16 ore.

6. **Acid cromic:** se amestecă în părți egale acidul cromic și clorură de calciu 5% timp de 8—12 ore.

7. **Clorat de potasiu:** într-un flacon cu 50 ml alcool de 50% se adaugă o cantitate mică de clorat de potasiu, apoi cîteva picături de acid clorhidric concentrat; secțiunile se țin în soluție timp de 24—48 ore, apoi se spală.

8. **Clor în stare născîndă:** se introduce într-un recipient de sticlă cu deschidere largă alcool de 50°, apoi clorat de potasiu, astfel încît să se formeze un strat continuu și regulat la fundul recipientului; se pun în alcool două port-lame din sticlă și apoi se introduc secțiunile de clorat de potasiu; se adaugă cu precauție, cu ajutorul pipetei, acidul clorhidric concentrat, pînă cînd apare în alcool o tentă verzuie, ceea ce indică formarea clorului; pînza de clor trebuie să scalde complet secțiunea; flaconul se va închide bine și se va lăsa clorul să acționeze un timp variabil; în general depigmentarea melaninei se produce în 24 ore; se scot secțiunile și se spală abundent.

9. **Apa de brom:** apă de brom 1% timp de 12—24 ore.

Rezultat: fiecare agent oxidant (acid cromic, permanganat de potasiu) albește toți pigmenții destul de ușor și prelungirea albirii ne permite diferențierea între ei (vezi tabelele 17 și 18).

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 17

Caracterele şi proprietăţile fizice ale principalilor pigmenţi (după Ganter şi Jollés)

Caractere şi proprietăţi fizice	Melanine	Pigment malaric
Aspect şi coloraţie naturală	Granule foarte fine sau blocuri groase de mai mulţi microni. Coloraţie variabilă de la galben spre brun sau negru	Granule mici rotunjite 2—3 microni sau bulgări neregulaţi, muriformi, care pot atinge de la 30—40 microni. Coloraţie brună pînă la brun-negru.
Fluorescenţă	0	0
Solubilitate	Insolubilitate, în apă, alcool, solvenţi organici, acizi şi alcali diluaţi. Solubilitate incompletă în SO_4H_2 concentrat în timp de 20 minute la 56°C. Solubilitate în alcali forte în timpul unei perioade prelungite Rezistenţă prelungită la acţiunea pepsinei şi a tripsinei	Insolubilitate în apă, alcool, solvenţi organici, acizi diluaţi (acid oxalic 2% timp de 3 zile, HCl 2 sau 5% timp de 48 ore) SO_4H_2 concentrat, la 56°C timp de 20 minute. Solubilitate în acid acetic la 56°C timp de 3 zile şi mai ales în alcali (NaOH N/10 sau KOH de 10% timp de 15 minute, amoniac timp de 10 minute)

Scanned with OKEN Scanner

Ceride	Lipofuscine	Pigmentul — Dubin Johnson
Globule galbene, de 1 pînă la 20 microni	Granulaţie galbenă-brună	Pigment foarte fin sau puţin mai gros, de la 1 la 2 microni, galben-brun sau brun închis
Galben-verde care virează spre galben pal, pe secţiunile congelate. Brun-auriu pe secţiunile la parafină.	+ Galben-brun spre oranj	± Brun destul de pal
Insolubilitate în apă, alcool, solvenţi organici, acizi şi baze diluate. Rezistenţă la acţiunea pepsinei.	Insolubilitate în alcali forte. Solubilitate variabilă în solvenţi organici	Insolubilitate în apă, alcool şi solvenţi organici

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 17 (continuare)

Caractere și proprietăți fizice	Melanine	Pigment malaric
Decolorare (albire)	Rezistență la numeroși oxidanți în soluție diluată. Albire neregulată și inconstantă cu: acid cromic 5% (1 la 3 ore), MnO_4K 0,5% (20 minute pînă la mai multe ore). Albire completă prin: H_2O_2 10% timp de 24 pînă la 48 ore, acid performic și peracetic de la 1 la 2 ore.	Albire prin: H_2O_2 (10 volume timp de 24 ore). MnO_4K (0,25% timp de 48 ore).

Tabelul 18

Caracterele histochimice ale diferiților pigmenți (după Pearse și Lillie)

Caracteristici histochimice	Lipofu		
	ceride (ficat)	glande apocrine	grăsime perirenală
Coloraţie naturală	Galben-brun	Galben-pal	Galben pal
Eosinofilie	0	+	±
Bazofilie (azur sau tionină)	+	0	+

Scanned with OKEN Scanner

Ceride	Lipofuscine	Pigmentul — Dubin — Johnson
Rezistență la MnO_4K, acid cromic, H_2O_2, apă de clor sau brom, acid performic sau peracetic în timp de mai puțin de 48 ore.	Rezistență la : MnO_4K, acid cromic, H_2O_2, apă de brom sau de clor, acid performic sau peracetic în timp de mai puțin de 48 ore. Albire în acid performic în 24 ore.	Rezistență la : H_2O_2, brom, clor, acid cloric în timp de mai puțin de 24 ore. Albire prin acid performic incomplet în 2 ore, complet în 24 ore.

scine

macrofage	celule nervoase	fibre miocardice	ficat	reticulul suprarenal	celule LEYDIG și epididime	ovar
Galben spre brun	Galben-brun	Brun-aurit	Brun-deschis	Brun-aurit	Brun	Brun
0	0		0	0	0	0
+	+	Slab + (verde)	+	+	+	± Spre + (verde deschis pînă la verde închis)

Tabelul 18 (continuare)

Caracteristici histochimice	Lupofu		
	Ceride (ficat)	glande apocrine	grăsime perirenală
Argentafinitate	Slab +	Slab +	Slab +
Reacţia lui schmoral	±	Slab +	Slab +
Reacţia pas	±	0	0
Negru sudan pe secţiuni la parafină	+	+	+
Reacţia acidului performic—schif	În general +	+	+
Acido-rezistenţă	+	0	0
Reacţie plasmală	0	Parţial +	Parţial +
Reacţia hematoxilină—alaun cromic	0	0	0
Reacţii peroxidate	0	+	+
Fluorescenţă	Brun-aurit	Galben-aur	Brun-aurit

2. REACŢII HISTOCHIMICE PENTRU PIGMENŢI

REACŢII ARGENTAFINE: **Principiu:** precipitarea argintului metalic, negru, din sol. sărurilor de argint, sub influenţa substanţelor reducătoare (în speţă pigmenţi). **Procedee operative:** se poate efectua o reacţie

Scanned with OKEN Scanner

scine

macro-fage	celule nervoase	fibre miocardice	ficat	reticulul suprarenal	celule leydig și epididime	ovar
Slab +	Slab +	O mino-ritate +	Slab +	+	+	Slab +
Slab +	+	0 sau slab +	+	+ (Verde spre albastru închis)	+	±
±	±	±	±	±	+	+
±	±	+	±	±	+	+
+	În gene-general +	O mino-ritate +	În general +	±	O mino-ritate +	±
Slab +	+	În gene-ral +	+	+	+	Parțial +
Parțial +	0	0	0	0		
0	+	+	+	+		
+	0	0	0	0		
Gal-ben	Galben de aur	Galben pînă la oranj	Brun	0		

argentafină în diferite feluri, utilizînd variate săruri de argint și în pH alcalin, neutru sau acid.

Metoda cu nitrat de argint amoniacal, după Fontana, **Reactivi:** a) sol. Gram: iod 1 g; iodură de potasiu 2 g; apă dist. 300 ml; b) sol. Fontana (vezi pag. 104).

Scanned with OKEN Scanner

Varianta Lison: la o sol. de nitrat de argint 5% se adaugă picătură cu picătură amoniacul, pînă cînd precipitatul format va fi în totalitate dizolvat; se va adăuga cu multă atenţie, picătură cu picătură, nitrat de argint 5% pînă la apariţia unei tulburări persistente; lichidul nu trebuie să miroasă a amoniac; înainte de utilizare se va decanta. **Tehnica de lucru:** secţiunile se deparafinează, se aduc la apă; 1. se va trata cu sol. iodată Gram, timp de 10 min.; 2. spălare îndelungată în apă dist., timp de 15 min., pînă la 2 ore; 3. secţiunile se introduc în sol. de nitrat de argint amoniacal Fontana, în recipient deschis şi la întuneric timp de 18—24 ore; 4. clătire în apă dist.; 5. virare într-o sol. de 0,1% clorură de aur timp de 4 min.; 6. clătire în apă dist.; 7. fixare într-o sol. 5% de hiposulfit de sodiu timp de 2 min.; 8. se trec prin apă. apoi se colorează nucleii cu Kernechtrot timp de 5 min.; 9. se trec prin alcooluri, xilen şi se montează în balsam. **Rezultat:** substanţele reducătoare sînt colorate în negru cum ar fi: pigmenţii, melanina, lipofuscina, bilirubina.

Reacţia de reducere a lui Schmorl. **Principiu:** reducerea unui amestec de sare ferică-fericianură de potasiu în ferocianură ferică sau albastru de Prusia. **Reactivi:** a) sol. de fericianură de potasiu-sare ferică: sol. apoasă de clorură ferică (sau sulfat) 1%, 30 ml; sol. apoasă proaspăt preparată de fericianură de potasiu 1%, 10 ml; amestecul trebuie făcut înainte de întrebuinţare. **Tehnica:** secţiunile deparafinate se aduc la apă; 1. secţiunile se introduc în soluţia de fericianură de potasiu—sare ferică timp de 5 min.; 2. spălare în apă curentă; 3. colorarea nucleilor cu roşu nuclear timp de 2—3 min.; deshidratare rapidă în alcool absolut, xilen, montare în balsam sau DPX. **Rezultat:** substanţele reducătoa-

Scanned with OKEN Scanner

re se colorează în albastru închis, cum ar fi pigmenţii melanici, lipofuscinici; la fel se colorează granulaţiile cromafine şi enterocromafine, substanţe care conţin grupa S-H.

Reacţia cu sulfat feros, (după Lillie). **Principiu:** formarea de complex necolorat între melanină şi ionii feroşi, care sînt apoi puşi în evidenţă prin reacţia cu fericianură de potasiu (formarea de fericianură feroasă sau albastru de Turnbull). **Tehnica:** secţiunile deshidratate se aduc la apă; 1. se introduc într-o soluţie apoasă de sulfat feros 2,5% timp de 1 oră; 2. spălare în 4 băi succesive de apă dist. a 5 min. fiecare; 3. introducerea într-o sol. de fericianură de potasiu 1% în acid acetic 1%, timp de 30 min.; 4. spălare într-o sol. de acid acetic 1%; 5. colorarea de fond cu roşu nuclear timp de 5 min.; 6. alcooluri, xilen, montare în DPX. **Rezultat:** melanina se colorează în verde închis.

Reacţia cu albastru de Nil sulfuric, (după Lillie). **Principiu:** reacţia pare a fi legată de bazofilia acestor pigmenţi; un procedeu de extragere cu acetonă, cuplat cu colorarea cu albastru de Nil, permite deosebirea între melanine şi lipofuscine, care sînt ambele bazofile. **Reactivi:** a) sol. sulfurică albastru de Nil: acid sulfuric 1% 100 ml; albastru de Nil A 0,05 g. **Tehnica:** două secţiuni sînt tratate simultan după deparafinare şi hidratare; 1. secţiunea A şi B se colorează în sol. sulfurică de albastru de Nil A timp de 20 min.; 2. secţiunea A se saplă în apă curentă timp de 10—20 min. şi se montează cu glicerogel; secţiunea B se scufundă rapid în acid sulfuric 1%; se deshidratează în 4 băi succesive de acetonă, xilen şi montare în DPX. **Rezultat:** melanina în secţiunea A şi B se colorează în verde întunecat, iar lipofuscina în secţiunea A se colorează

Scanned with OKEN Scanner

în albastru închis sau în verde închis; în secțiunea B se colorează în brun, culoarea naturală a pigmentului.

Reacția nucleului indolic al melaninei, (după Lillie). **Principiu:** reacția de condensare a nucleului indolic, constituent al melaninei cu p. dimetilaminobenzaldehidă în mediu clorhidric. **Reactivi:** a) sol. de p-dimetilaminobenzaldehidă: acid clorhidric conc. (37,5%) 10 ml; acid acetic glacial 30 ml; p-dimetilaminobenzaldehidă 1 g. **Tehnica:** piese fixate în formol, secțiuni deparafinate și aduse la apă; 1. scufundarea în acid acetic glacial; 2. tratare cu sol. de p-dimetilaminobenzaldehidă timp de 5 min.; 3. scufundare în acid acetic glacial; 4. trecerea prin 3 băi de xilen; 5. montare într-un amestec de părți egale de xilen și caprat de celuloză; **Rezultat:** melanina se colorează în negru spre negru-verzui (această culoare este uniformă peste tot în melaninele recent formate, anumite melanine ca cele din peri sau din sistemul nervos, rămîn brune); granulele de zimogen ale pancreasului și substanța cristalinului reacționează de asemenea; serotonina nu se colorează.

Punerea în evidență a porfirinelor prin fluorescență. **Principiu:** detectarea fluorescenței secundare roșie-oranj a porfirinelor după acțiunea unui solvent adecvat. **Tehnica:** fluorescența porfirinelor poate fi cercetată pe secțiuni fixate și incluse la parafină, sau mai bine, piese tratate prin criodesicație și incluse la parafină; 1. secțiunea este deparafinată prin trecere în xilen; 2. secțiunea se trece direct în glicerină; 3. se pune peste secțiune un amestec de glicerină-amoniac concentrat (2 : 1 sau 3 : 1), se acoperă cu o lamelă și se examinează imediat la microscopul cu ultraviolete. **Rezultat:** porfirinele au o fluorescență roșie-oranj.

Scanned with OKEN Scanner

Reacţia hemoglobinei cu albastru cyanol (după Faudrez şi Lambert). **Principiu:** colorarea electivă a hemoglobinei cu cyanolul, colorant acid, la pH 6,4. **Reactivi:** a) sol. tamponată de albastru cyanol: prepararea unei sol. de carmin-alaun prin fierberea timp de 1 oră; sol. de alaun de potasiu 3% 100 ml; carmin 2 g; se amestecă în părţi egale: sol. de carmin-alaun cu o sol. apoasă de albastru cyanol 1% tomponată cu un tampon Mc Ilvaine la pH 6,4. **Tehnica:** secţiunile deparafinate se aduc la apă; 1. se introduc în sol. tamponată de albastru de cyanol timp de 1—24 ore; 2. scufundare în sol. tampon utilizată; 3. diferenţierea în alcool 70% timp de cîteva secunde, pînă cînd culoarea secţiunii virează spre roşu; 4. alcool absolut, xilen, montare în balsam. **Rezultat:** hemoglobina se colorează în albastru pe un fond roz.

Reacţia cu albastru turnbull pentru hemosiderină. (vezi pag. 90). **Tehnica:** 1. după secţionarea la gheaţă, parafină sau celoidină, secţiunile se aduc în apă distilată; 2. secţiunile se introduc în sol. concentrată de sulfat de amoniu (de culoare galbenă) timp de 1—24 ore, de obicei este suficient 1—2 ore; 3. spălare atentă în apă dist.; 4. secţiunile se introduc într-o sol. proaspătă formată din părţi egale de: fericianură de potasiu 20% şi acid clorhidric 1%; 5. spălare abundentă în apă dist.; 6. colorarea nucleilor cu alaun-carmin sau paracarmin; 7. spălare în apă distilată; 8. deshidratare, clarificare, montare în balsam. **Rezultat:** pigmenţii care conţin fier se colorează în albastru, nucleii în roşu.

Reacţia perls, pentru pigmenţii cu fier (vezi pag. 90 şi 287).

Reacţia cu brom pentru bilirubină, (după Lillie şi Pizzolato). **Principiu:** oxidarea bilirubinei cu

Scanned with OKEN Scanner

brom în sol. de tetraclorură de carbon duce la formarea de produși colorați în roșu purpuriu pînă la violet-negru, care seamănă cu produșii din reacția lui Gmelin. **Tehnica:** piesele fixate în formol sînt incluse la parafină și secționate; 1. secțiunea este deparafinată în xilen; 2. se spală în tetraclorură de carbon; 3. se trec într-o soluție 0,5% de brom în tetraclorură de carbon timp de 10—90 min. (după 30 min. în general rezultatele sînt bune); 4. spălare în tetraclorură de carbon; 5. trecere în xilen, montare în caprat de celuloză. **Rezultat:** bilirubina se colorează în roșu purpuriu, pînă la violet-negru.

Reacția pentru bilirubină (după Stein). **Principiu:** oxidarea bilirubinei în biliverdină sub influența iodului. **Reactivi:** a) reactiv Stein; Lugol 30 ml; tinctură de iod a lui Codex 10 ml; b) reactiv Caroli-Étève: Lugol 2 volume, tinctură de iod 1 volum. **Tehnica:** secțiunea deparafinată este adusă la apă; 1. secțiunea se introduce în reactivul Stein timp de 12—18 ore; 2. spălare în apă curentă timp de 5 minute; 3. decolorare într-o sol. apoasă de hiposulfit de sodiu 5% timp de 30 sec.; 4. spălare în apă; 5. colorarea nucleilor cu carmin-alaun sau roșu nuclear; 6. spălare în apă; 7. alcool, xilen, montare în balsam.

Reacția pentru bilirubină (după Kutlik). **Principiu:** oxidarea bilirubinei în biliverdină cu alaun de fier sau clorură ferică. **Tehnica de lucru:** secțiunea deparafinată este adusă la apă: 1. se introduce într-o sol. apoasă de alaun de fier 5% sau de clorură ferică 5% în acid acetic 2%, timp de 15 min.; 2. spălare rapidă în apă dist.; 3. scufundarea în alcool de 95°; 4. colorarea de fond cu galben briliant I de 1% în alcool de 95%, timp de 10 min.; 5. scufundare

Scanned with OKEN Scanner

în alcool de 95°; 6. uscare cu hîrtie de filtru, xilen, montare în balsam. **Rezultat:** biliverdina se colorează în verde smarald, pe un fond galben.

Reacţia pentru bilirubină (după Glenner). **Principiu:** oxidarea bilirubinei prin acţiunea bicromatului de potasiu asupra pieselor nefixate, secţionate prin congelare. **Reactivi:** a) sol. tamponată de bicromat de potasiu: sol. apoasă de bicromat de potasiu 3% 25 ml; tampon fosfat HCl pH 2,2 (8 ml HCl 0,1 N + 17 ml Kh_2PO_4 0,1 N) ml; b) formol-calciu după Baker (vezi pag. 23). **Tehnica:** piesele nefixate, secţionate la congelare, montate pe lamă şi uscate, sau secţionate la criostat; 1. se acoperă secţiunea cu o sol. tamponată de bicromat de potasiu (a) şi se lasă să acţioneze 15 min.; 2. spălare în apă curentă timp de 5 min.; 3. fixare în formol-calciu după Baker timp de 15—25 min.; 4. se spală în apă curentă timp de 5 min.; 5. se va colora cu safranină sau hematoxilină; 6. deshidratare rapidă în alcooluri; xilen, montare în DPX. **Rezultat:** bilirubina se colorează în verde smarald.

Metodă combinată pentru bilirubină, hemosiderină şi lipofuscină (după Glenner). Această metodă se efectuează pe secţiuni la gheaţă nefixate, asociindu-se punerea în evidenţă a bilirubinei prin procedeul de mai sus, cu evidenţierea hemosiderinei prin reacţia Perls şi a lipofuscinei prin oil red O. **Tehnica:** secţiunile se montează pe lame şi se usucă; 1. se tratează cu o sol. apoasă de fericianură de potasiu 2% timp de 5 min.; 2. se tratează cu un amestec în părţi egale de fericianură de potasiu 2% şi acid acetic 5% timp de 20 min.; 3. clătire în apă curentă; 4. tratarea cu o sol. tamponată de bicromat de potasiu, ca la tehnica anterioară; 5. colorare cu oil red O sol. de alcool izopropilic timp

Scanned with OKEN Scanner

de 20 min.; 6. spălare în apă curentă timp de 5 min.; 7. montare în glicerogel sau siropul lui Apathy. **Rezultat:** bilirubina este verde-întunecat; hemosiderina este albastru închis, lipofuscina este roşu-orange.

REACŢIA PENTRU BILIRUBINĂ, (după Hall). **Principiu:** oxidarea bilirubinei în biliverdină, cu reactivul lui Fouchet. **Reactivi:** a) reactivul Fouchet: acid tricloracetic 25 g; apă distilată 100 ml; clorură ferică 10% 10 ml; b) picro-fuxină Van Gieson. **Tehnica:** secţiunile deparafinate sînt aduse la apă; 1) sînt introduse în reactivul Fouchet proaspăt filtrat, timp de 5 min.; 2. spălare în apă, apoi trecerea în apă dist.; 3. colorarea în picrofuxină Van Gieson timp de 5 min.; 4. alcool de 95° şi absolut, xilen, montare în balsam. **Rezultat:** bilirubina se colorează în verde-smarald.

TEHNICA PENTRU BILIRUBINA CONJUGATĂ ŞI TOTALĂ, (după Raia). **Principiu:** se pun în evidenţă două tipuri de bilirubină, pe secţiuni la criostat de ţesut proaspăt congelat, prin cuplare cu dicloro-2, 4 anilindiazotat. Bilirubina conjugată se colorează în albastru violaceu; bilirubina liberă nu se colorează, dar dacă facem să acţioneze sarea de diazonium în prezenţa unui accelerator, bilirubina totală este atunci colorată în roşu. **Reactivi:** a) **soluţia mamă:** sol. A: se dizolvă 200 mg de dicloro-2, 4 anilină în 100 ml apă care conţine 2,5 ml acid clorhidric concentrat (d=1,19), apoi se filtrează; soluţia B: sol. apoasă 1% de nitrit de sodiu: aceste soluţii trebuie proaspăt preparate, maximum de 2 săptămîni şi conservate la întuneric şi refrigerator; soluţia C: se dizolvă 6 g de cofeină; 10 g benzoat de sodiu şi 10 g de uree în 100 ml apă; la 35 ml din această soluţie se adaugă 25 ml dintr-o sol. de formol 40% şi se completează pînă la 85 ml cu apă, apoi se adaugă 15 ml de metiletilcetonă;

Scanned with OKEN Scanner

b) **reactiv de lucru:** aceşti reactivi se prepară numai înaintea utilizării lor şi se ţin în baie de gheaţă: 1. reactiv diazoic apos: se amestecă sol. B 1 volum cu soluţia A 50 volume, se păstrează timp de 20 min. în baie de gheaţă înainte de momentul precis al întrebuinţării; 2. reactiv diazoic cu accelerator: se amestecă reactiv diazoic 1 volum cu sol. C 2 volume. **Tehnica:** fragmentele tisulare proaspete sînt repede congelate şi secţionate la criostat la 6 microni şi culese pe lame, se lasă să se usuce timp de 1 oră la întuneric şi la temp. laboratorului (se pot de asemenea conserva secţiunile, mai multe săptămîni, la întuneric şi la rece, dacă nu putem efectua toate reacţiile ce urmează).

PUNEREA ÎN EVIDENŢĂ A BILIRUBINEI CONJUGATE: 1. introducerea secţiunii în reactiv diazoic apos, timp de 10 min.; 2. spălare în apă curentă, timp de 3 min.; 3. fixare în formol 10% timp de 3 min.; 4. colorarea nucleilor dacă este necesar în hemalaun; spălare în apă; 5. montare cu sirop Apathy. **Rezultat:** bilirubina conjugată se colorează în albastru-violaceu.

PUNEREA ÎN EVIDENŢĂ A BILIRUBINEI TOTALE: 1. introducerea secţiunii în reactiv diazoic cu accelerator timp de 8 min.; 2. spălare în apă curentă timp de 3 min.; 3. colorarea nucleilor dacă este necesar cu hemalaun; spălare în apă; 4. montare în siropul Apathy. **Rezultat:** bilirubina totală se colorează în roşu; aprecierea bilirubinei se face prin extracţie, în comparaţie cu secţiunile colorate prin cele două metode.

COLORAREA LIPOFUSCINEI CU LIZOCROMI. **Principiu:** lipofuscinele se colorează cu lizocromi (ca de exemplu cu oil red O sau negru de Sudan B) pe secţiuni la parafină. **Tehnica:** piesele fixate în for-

Scanned with OKEN Scanner

mol sau Bouin se secţionează şi se aduc la apă; apoi se vor colora cu oil red O sau cu negru de Sudan B ca în tehnica de colorare (pag. 318) se montează cu glicerină sau glicerogel şi se examinează. **Rezultat:** lipopigmenţii se colorează în roşu-oranj cu Oil red O sau în negru de Sudan negru B.

TEHNICA PENTRU LIPOFUSCINĂ CU HEMATOXILINĂ ALAUN DE CROM, (după G o m o r i). **Principiu:** colorarea cu hematoxilină-alaun de crom după oxidare cu permanganat sulfuric. **Reactivi:** a) p e r m a n g a n a t s u l f u r i c: permanganat de potasiu 0,5% 47,5 ml; acid sulfuric 3% 2,5 ml; b) h e m a t o x i l i n ă: se amestecă în părţi egale: sol. apoasă proaspătă de hematoxilină 1% cu alaun de crom 3% apoi se adaugă pentru 100 ml de amestec: bicromat de potasiu 5% 2 ml şi acid sulfuric 5% 1 ml; soluţia se lasă în repaus 2—3 zile înainte de utilizare; colorantul se conservă 1—2 luni; c) alcool clorhidric: acool 70° 100 ml; acid clorhidric (d=1,19) 1 ml. **Tehnica:** secţiunea deparafinată se aduce la apă; 1. secţiunea se oxidează în sol. de permanganat sulfuric (a) timp de 1—2 minute; 2. albire în acid oxalic 1% timp de 1 min.; 3. spălare în apă; 4. colorare în hematoxilină-alaun de crom (b) timp de 10 min.; 5. diferenţiere în alcool clorhidric (c); 6. colorare de fond cu enzimă 1% timp de 5 min.; 7. spălare în apă; 8. deshidratare rapidă în alcooluri, xilen şi montare în DPX. **Rezultat:** lipofuscina se colorează în albastru negru, nucleii purpuriu, iar citoplasma în roz; melanina şi alţi pigmenţi se colorează în brun, culoarea naturală.

TEHNICA ZIEHL-NEELSEN PENTRU LIPOFUSCINĂ ACIDOREZISTENTĂ. **Principiu:** colorarea cu fuxină bazică care rezistă la acţiunea acizilor. **Reactivi:** a) fuxină bazică: fuzină bazică 10 g; fenol 50 g; alcool etilic 95° 100 ml;

Scanned with OKEN Scanner

apoi apă distilată 1000 ml; b) alcool-acid: alcool 70° 100 ml; acid clorhidric (d=1,19) 1 ml. **Tehnica:** secțiunile deparafinate sînt aduse la apă; 1. colorarea în sol. de fuxină bazică (a) la 60° timp de 3 ore; 2. spălare în apă curentă; 3. diferențierea în alcool-acid (b) pînă cînd hematiile se colorează în roșu-palid; 4. colorare ușoară a nucleilor cu hemalaun; 5. spălare în apă curentă; 6. alcooluri, xilen, montare în DPX. **Rezultat:** lipofuscina acidorezistentă se colorează în roșu-briliant; melanina rămîne brună; lipofuscinele sînt roz.

Tehnica pentru lipofuscine, cu sulfat albastru de Nil, (după H u e k). **Principiu:** reacția se bazează pe bazofilia intensă și rapidă a lipofuscinelor care rezistă la albirea cu apă oxigenată. **Tehnica:** secțiunile se deparafinează și se aduc la apă; 1. colorare într-o sol. apoasă saturată de sulfat de albastru de Nil, proaspăt preparat, timp de 30 min.; 2. clătire în apă dist.; 3. trecere în apă oxigenată 10% timp de 24 ore; 4. spălare în apă curentă; 5. montare în glicerogen. **Rezultat:** lipofuscina se colorează în albastru, melanina este incoloră.

T EHNICA CU LUGOL PENTRU CAROTENOIZI, (după L i s o n). **Principiu:** formarea unui derivat iodat de carotenoizi de culoare violetă, prin acționarea unei soluții de iod-iodurat. **Reactivi:** a) s o l u ț i a i o d o - i o d u r a t ă; iod 1 g; iodură de potasiu 7 g; apă dist. 100 ml. **Tehnica:** piesele proaspăt secționate la criostat sau fixate în formol se secționează prin congelare; 1. secțiunea se introduce în soluția iodo-iodurată (a); se controlează apariția culorii violete; 2. montare în glicerogel. **Rezultat:** carotenoizii se colorează în violet.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL XI

VITAMINE ŞI AMINE BIOGENE

A. VITAMINE

Reacţiile histochimice pentru vitamine sînt mai puţin sigure, atît sub aspectul localizării, cît şi sub cel al aprecierii cantitative. Cînd este posibil se recomandă să fie controlate prin dozări biochimice. Sînt întrebuinţate mai ales reacţiile pentru vitaminele A, B, C şi D.

1. VITAMINA A

Deoarece vitamina A este solubilă în solvenţii lipidelor şi pentru că reacţiile de culoare propuse sînt instabile şi inconstante, se recurge mai ales la proprietăţile fluorescente ale vitaminei A.

TEHNICA EVIDENŢIERII PRIN FLUORESCENŢĂ. **Principiu:** vitamina A are o fluorescenţă verde, care se poate evidenţia la microscopul de fluorescenţă. Spre deosebire de alte substanţe, fluorescenţa verde a vitaminei A dispare repede la razele ultraviolete. **Tehnica de lucru:** se fac secţiuni proaspete la microtomul de gheaţă sau pe piese fixate în formol 10% timp de 12—18 ore şi apoi secţionarea la gheaţă. Secţiunile sînt, în ambele cazuri, montate în apă

Scanned with OKEN Scanner

sau glicerină și examinate imediat. **Rezultat:** fluorescența verde dispare în cîteva secunde pînă la cîteva minute.

2. GRUPUL VITAMINELOR B

Din grupul vitaminelor B, doar vitaminele B_1 și B_2 se pretează evidențierii prin **tehnica de fluorescență. Principiu:** vitamina B_1 posedă o fluorescență albastră, dată de produsul său de oxidare (autooxidare sau oxidare provocată prin acțiunea fericianurii de potasiu în mediu alcalin), **tiocromul.** Vitamina B_2 are o fluorescență verde (fluorescența primară). **Tehnica de lucru:** piesele fixate în formol 10% sînt secționate prin congelare și montare în apă sau glicerină; sau după criodesicare se includ în parafină, se secționează și se montează în mediu nefluorescent. **Rezultat:** vitamina B_1 are fluorescența albastră, vitamina A rezistă la expunerea prelungită la raze ultraviolete, dar dispare sub acțiunea acidului clorhidric 0,1 N sau a amoniacului.

Metoda Tanaka și Cooper. **Principiu:** punerea în evidență a vitaminei B_1 prin fluorescența tiocromului după tratare cu bromună de cianogen. **Reactivi:** a) bromură de cianogen: se prepară prin decolorarea apei de brom cu o soluție de 10%, rece, de cianură de potasiu; se va lucra sub nișă. **Tehnica de lucru:** țesuturile vor fi imediat congelate în izopentan răcit în azot lichid sau într-un amestec de acetonă-gheață carbonică, apoi desicate sub vid la —35°C timp de 3—5 zile. Se vor include în parafină sub vid, apoi secționate la 5—8 microni; 1. se deparafinează o secțiune cu atenție, punînd o picătură de xilen pe preparat; 2. se introduce lama într-un recipient din sticlă în care s-a introdus o capsulă cu

Scanned with OKEN Scanner

bromură de cianogen și alta cu amoniac; 3. se închide ermetic recipientul și se introduce într-o etuvă la 40—70°C timp de 30—50 minute; 4. se scoate preparatul și se montează într-un oleu mineral. Se examinează la microscopul cu fluorescență. **Rezultat:** tiocromul are o fluorescență albastră.

3. VITAMINA C

Principiul reacțiilor de evidențiere a vitaminei C este cel propus în 1928 de Szent-Györgyi: formarea de granulații negre în țesutul sau celulele care conțin acid ascorbic, în prezența azotatului de argint.

Metoda Barnett, Bourne și Fischer. **Reactivi:** a) soluție apoasă 5% de azotat de argint 100 ml; acid acetic glacial 5 ml. **Tehnica de lucru:** piesele proaspăt recoltate se vor tăia subțire sau la criostat; 1. secțiunile vor fi tratate cu azotat de argint (soluția a) timp de 5—10 minute; 2. secțiunile vor fi tratate la întuneric cu amoniac sol. apoasă 5% timp de 10—15 minute; 3. spălare în apă distilată; 4. montare în glicerină. **Rezultat:** la nivelul depozitelor de vitamina C vor apare granulații negre de argint.

Metoda Sosa. **Reactivi:** a) soluție apoasă 10% de azotat de argint 100 ml; acid acetic glacial 1 ml. **Tehnica de lucru:** 1. se va introduce un fragment mic de țesut în azotat de argint (soluția a) timp de o oră; 2. se trece fragmentul într-o soluție apoasă 10% de sulfit de sodiu timp de o oră. 3. se pune fragmentul într-o soluție apoasă 10% de hiposulfit de sodiu timp de o oră; 4. spălare în apă distilată; 5. deshidratare, clarificare și includere în parafină, după tehnica obișnuită; 6. secționare la 5—10 mi-

Scanned with OKEN Scanner

croni; 7. se poate face o coloraţie de fond; se deshidratează, se clarifică şi se montează. **Rezultat:** apar granulaţii negre de argint la nivelul localizărilor tisulare ale vitaminei C.

Metoda Eränkö. **Reactivi:** a) alcool 96°, 9 ml; acid acetic glacial 1 ml; sol. apoasă 20% de azotat de argint 10 ml. **Tehnica de lucru:** piesele proaspete vor fi secţionate prin congelare sau la criostat; 1. secţiunile se introduc în soluţia de azotat de argint (sol. a) timp de 10 secunde pînă la cîteva minute; 2. spălare într-o soluţie apoasă 5% de acid acetic; 3. spălare în apă distilată; 4. montare în glicerină. **Rezultat:** localizarea tisulară a vitaminei C se observă prin granulaţii negre.

Metoda Barka şi Anderson. **Reactivi:** a) soluţie apoasă 5% acid acetic, 100 ml; azotat de argint 5—10 g. **Tehnica de lucru:** 1. un fragment mic de ţesut se introduce în soluţia a, de azotat de argint timp de 1—3 ore; 2. spălare în apă distilată sau într-o soluţie apoasă 0,5% de acid acetic timp de 30—40 minute; 3. deshidratarea, clarificarea şi includerea în parafină; secţionarea la 5—6 microni; 4. colorare de fond cu hematoxilină-eozină; 5. clarificare şi montare în balsam. **Rezultat:** granulaţiile negre de azotat de argint sînt localizate la nivelul vitaminei C tisulare.

Reacţia metacromatică (după Nunziante Cesaro şi Granata). **Principiu:** produsul de reacţie între acidul ascorbic şi azotatul de argint are un caracter puternic acid, această aciditate poate fi pusă în evidenţă prin reacţia metacromatică. **Reactivi:** a) soluţie de azotat de argint: soluţie apoasă 5% de azotat de argint, acidifiată cu acid acetic glacial pînă la un pH 2,0—2,5 (se pun cam 6—7 ml de acid la 100 ml soluţie); coloranţi metacromatici; b) amestec

Scanned with OKEN Scanner

în părți egale de: soluție apoasă 0,25% albastru de metilen și soluție apoasă 0,25% de albastru de toluidină; c) soluție apoasă 1% de acid acetic glacial 100 ml; soluție apoasă 0,25% de albastru de metilen 2,5 ml; soluție apoasă 0,25% de albastru de toluidină 2,5 ml. **Tehnica de lucru:** se fac secțiuni prin congelare sau la criostat pe fragmente proaspete de țesut: 1. secțiunea se va trata cu soluție „a" de azotat de argint timp de 2—6 ore, uneori chiar 24 ore; 2. se trece apoi într-o soluție apoasă 4% de amoniac timp de cîteva secunde, apoi într-o soluție de amoniac 10% timp de 2 minute; 3. spălare în apă distilată; 4. se introduce într-una din cele două soluții de coloranți metacromatici; fie în soluție b timp de 20—25 minute, fie în soluția **c** timp de 2 minute; 5. spălare în apă curentă; 6. montare cu glicerină. **Rezultat:** la nivelul localizărilor de vitamina C apar granulații roșii-vii.

4. VITAMINA D

METODA ARAKI, CHIN ȘI RYO PRIN FLUORESCENȚĂ. **Principiu:** vitamina D prezintă, pe secțiuni la gheață în țesuturi fixate în formol o fluorescență galbenă trecătoare. Această fluorescență nu se produce pe secțiuni tratate în prealabil cu un solvent organic. **Tehnica:** piese mici fixate în formol 10—20% la întuneric, timp de 30—60 minute; 1. spălarea pieselor în apă timp de 10—30 minute; 2. secționarea prin congelare; 3. montarea în glicerină și examinarea imediată la microscopul cu ultraviolete (fluorescența vitaminei D dispare în cîteva minute, în timp ce a vitaminei A dispare mai rapid). **Control:** pentru a diferenția vitamina D de vitamina A, se vor examina secțiunile după ce au fost tratate cu un solvent organic (eter, cloroform sau alcool) timp

Scanned with OKEN Scanner

de 30 minute; acest tratament extrage vitamina D dar nu și vitamina A. **Rezultat:** vitamina D are o fluorescență galbenă slabă, care dispare în cîteva minute.

B. AMINE BIOGENE

Majoritatea reacțiilor de identificare pentru acest grup de substanțe se bazează pe faptul că ele conțin gruparea fenol. Sînt aplicabile deci: reacția cromafină, argentafină, azoreacția etc. Nu se va omite însă faptul că și alte categorii de substanțe răspund pozitiv la aceste reacții și că deci se impun precauții pentru controlul specificității lor. Se recurge de asemenea, foarte des la microscopia cu fluorescență pe secțiuni prin congelare datorită faptului că, după fixări cu formol, unele amine formează cu fixatorul un derivat tetrahidro-izochinolic, puternic fluorescent.

În toate cazurile se va acorda o mare importanță respectării fixării recomandate, deoarece deseori fixarea face parte din însăși reacția histochimică.

Reacția cromafină (după W o o d și B a r r n e t). (pag. 133). **Principiu:** coloratia brună obținută prin acțiunea oxidantă a unui amestec de săruri de crom asupra anumitor fenoli și derivați fenolici și în special asupra catecolaminelor. **Reactivi:** a) soluție tamponată de glutaraldehidă: soluție de glutaraldehidă 6,25% într-un tampon cacodilat 0,1 M la pH 7,4; b) soluție tamponată de bicromat de potasiu; 1. bicromat de potasiu 2,5 g; tampon acetat 0,2 M pH 4,1, 100 ml; sulfat de sodiu cristalizat 1 g; 2. aceeași soluție dar într-un tampon acetat 0,2 M pH 6,5. **Tehnica:** 1. fragmente mici se fixează în soluție tamponată de glutaraldehidă (sol. a), timp

Scanned with OKEN Scanner

de 2 ore; 2. fragmentul se lasă toată noaptea într-un tampon cacodilat 0,1 M pH 7,4; 3. un fragment se va pune la incubat într-o soluție tamponată de bicromat de potasiu (b_1) la pH 4,1, iar alt fragment în aceeași soluție dar cu pH 6,5 (b_2), timp de 24 ore la 4°C; 4. se fac secțiuni la gheață de 10 microni: 5. se montează în glicerogel. **Rezultat:** la pH 4,1 se colorează cafeniu numai granulațiile celulelor noradrenalinice; la pH 6,5 se colorează identic granulațiile celulelor noradrenalinice și adrenalinice.

Reacția cromafină pe secțiuni la parafină, (după Jones). **Tehnica:** fragmente mici sînt fixate într-o soluție de glutaraldehidă 5% într-un tampon de cacodilat 0,1 M la pH 7,2—7,4, timp de 6—24 ore, apoi sînt spălate în apă distilată timp de o noapte.

Fragmentele tratate cu acid osmic: 1. fragmentul se introduce într-o soluție de tetraoxid de osmiu 1% într-un tampon veronal-acetat la pH 7,4 timp de 20 minute; 2. se spală intens în apă; 3. se deshidratează și se include în parafină; 4. se secționează la 7 microni; secțiunile se lipesc pe lame, se deparafinează și se montează în DPX fără a se face colorarea nucleilor.

Fragmente tratate cu bicromat de potasiu: 1. un fragment se introduce într-o soluție apoasă de 3,5% de bicromat de potasiu, timp de 6—12 ore; 2. se spală intens în apă; 3. se deshidratează și se include în parafină; 4. se secționează la 7 microni, secțiunile se prind pe lame și se aduc la apă; 5. se colorează nucleii cu hematoxilină, se spală în apă de robinet, se deshidratează și se montează în DPX.

Fragmente tratate cu bicromat de potasiu apoi cu azotat de argint amoniacal; timpii 1—4 sînt ca la tehnica anterioară; 5. se introduce în soluția de

Scanned with OKEN Scanner

azotat de argint amoniacal timp de 24 ore; 6. se clătește în apă distilată; 7. se introduce într-o soluție apoasă 0,5% de clorură de aur, timp de 5 minute; 8. se clătește în apă distilată; 9. se tratează cu o soluție apoasă 5% hiposulfit de sodiu timp de 5 minute; 10. spălare, alcooluri, xilen, montare în DPX. **Rezultat:** după tratarea cu acidul osmic citoplasma celulelor noradrenalinice se colorează în brun întunecat, iar citoplasma celulelor adrenalinice se colorează în brun deschis. După tratarea cu bicromat de potasiu, citoplasmele celulare noradrenalinice (numai la adult) se colorează în galben; după tratamentul cu bicromat de potasiu și azotat de argint amoniacal, citoplasma celulelor noradrenalinice se colorează în negru intens.

Reacția cu iodat de potasiu, (după Hillarp și Hökfelt). Vezi de aceiași autori „Tehnici de histologie normală și patologică" Ed. Ceres, București, 1974, pag. 396.

Metoda Eränkö, prin fluorescență (idem pag. 397).

Metoda fluorescenței pentru catecolamine (după Dresse și Gerebtzoff). **Principiu:** Etilendiamina formează cu adrenalina și cu precursorii săi produși de condensație stabili și fluorescenți. **Reactivi:** a) soluție de etilendiamină (a se prepara cu puțin timp înainte de întrebuințare), se amestecă: etilendiamină 0,7 ml; diclorhidrat și etilendiamină 2 M (1,33 g pentru 5 ml de apă distilată, păstrată la frigider) 0,5 ml; se va completa la 30 ml cu apă distilată; această soluție trebuie pusă în etuvă la 50°C, cînd atinge această temperatură se vor introduce în soluție secțiunile 2 și 3. **Tehnica:** piesele fixate în formol-calciu Baker timp de 4—6 ore sînt secționate prin congelare la 25 microni și apoi sînt culese pe apă distilată; metoda completă se va efec-

Scanned with OKEN Scanner

tua pe trei secţiuni: a) prima secţiune este montată pe lamă în glicerină; b) a doua secţiune este tratată cu soluţie de etilendiamină la 50°C timp de 10—15 minute, apoi se spală în apă bidistilată şi se montează în glicerină; c) a treia secţiune este lăsată în soluţia de etilendiamină la 50°C timp de 2—3 ore, se spală şi se montează în glicerină. Cele trei secţiuni se examinează la microscopul cu fluorescenţă. **Rezultat:** a) prima secţiune are celulele noradrenalinice cu o fluorescenţă galben-verzuie; b) a doua secţiune are celulele noradrenalinice cu o fluorescenţă verzuie foarte intensă; c) a treia secţiune are celulele adrenalinice cu o fluorescenţă slabă.

METODA FLUORESCENŢEI PENTRU NERVII ADRENERGICI, (după F a l c k). **Principiu:** catecolaminele sînt transformate în compuşi intens fluorescenţi prin expuneri la vapori de formaldehidă, atunci cînd ele sînt incluse într-un strat proteic uscat. Rezultatele cele mai bune sînt obţinute pe secţiuni prin criodesicaţie; principala dificultate a acestei metode rezidă din necesitatea de a menţine conţinutul constant în apă al mediului, dacă este insuficient sau excesiv formarea produşilor de condensare fluorescenţi între catecolamine şi formaldehidă nu are loc. Metoda lui F a l c k şi diferitele sale variante permit evidenţierea catecolaminelor în numeroase ţesuturi şi este singura care le detectează în nervii adrenergici (spre deosebire de metodele anterioare care nu evidenţiază catecolaminele decît din medulosuprarenală). **Reactivi:** a) paraformaldehidă: conţinutul în apă al paraformaldehidei este elementul esenţial în reuşita metodei. Cu o săptămînă înainte de a executa metoda, se introduce pudra de paraformaldehidă într-un desicator care conţine o soluţie de acid sulfuric de densitate 1,20—1,30; această so-

Scanned with OKEN Scanner

luție menține o umiditate în jur de 58—80%, conținutul în apă al paraformaldehidei este astfel echilibrat timp de 8 zile, optim pentru a conferi o fluorescență vie produșilor de condensare cu catecolaminele. **Tehnica:** 1. criodesicația: piese foarte mici sînt recoltate rapid și congelate (izopropan/azot lichid), apoi se face criodesicația. F a l c k recomandă o criodesicație de 8—10 zile la —35°C; alți autori recomandă un timp mai scurt 4 zile la —40°C, sau 18 ore la —40°C; 2. formarea produsului fluorescent: piesa criodesicată se va expune la vaporii de paraformaldehidă pudră la 80°C timp de o oră (în acest scop se va suspenda piesa într-un săculeț din tifon rar, într-un recipient ermetic închis, care conține paraformaldehidă); 3. după expunerea la vapori de paraformaldehidă se face impregnarea în vid cu parafină la 60°C timp de 10 minute și se include; 4. se secționează la 5—10 microni; 5. secțiunile se etalează uscat pe lame nefluorescente, încălzindu-se ușor pînă la o ușoară topire a parafinei, pentru a se obține o aderență satisfăcătoare; 6. se va deparafina rapid în benzen și se montează în mediu nefluorescent, (se poate de asemenea examina fără deparafinare); se examinează la microscopul cu fluorescență; fluorescența se păstrează 2—3 zile. **Rezultat:** catecolaminele (adrenalina, noradrenalina și dopamina) au fluorescență verde; hydroxy-5 tryptamina are fluorescență galben-strălucitoare.

Metoda fluorescenței pe secțiuni la criotom (după S p r i g g s). Principiul metodei este același ca al metodelor precedente. **Tehnica de lucru:** 1. se introduce o picătură dintr-o soluție apoasă de clorură de sodiu 8‰ pe portobiectul unui criostat înconjurat de gheață carbonică, se depune un fragment mic de mușchi, apoi se pune fragmentul ce urmează să fie

Scanned with OKEN Scanner

studiat peste porţiunea de muşchi, dar se va evita orice contact cu soluţie salină; se congelează cu bioxid de carbon; 2. se vor executa cîteva secţiuni la criostat de 18 microni şi se vor introduce rapid într-un desicator care conţine anhidridă fosforică (nu se vor pune mai mult de 48 lame într-un desicator de 2 litri; aceste lame se vor introduce în serii de cîte 6, din 5 la 10 minute; numărul lamelor influenţeaza umiditatea şi dacă devine excesivă se va produce difuziunea catecolaminelor); 3. se va face condensarea vaporilor de paraformaldehidă cu catecolaminele, în desicatorul încălzit la 80°C, lucrînd ca în metoda Falck. Spriggs recomandă utilizarea a 3 concentraţii diferite de soluţii de acid sulfuric (de 21,25 şi 28%) pentru a putea obţine un grad optim de umiditate; 4) după o oră de expunere la vaporii de formol la 80°C, secţiunile sînt scoase din desicator şi montate în glicerină (se vor acoperi cu lamele nefluorescente). **Rezultat**: catecolaminele au o fluorescenţă verde spre galben-verzui; intensitatea fluorescenţei scade repede.

Reacţie cromafină pentru serotonină. **Principiu:** oxidarea hydroxy-5 triptaminei (serotonina) cu bicromat de potasiu determină formarea unui pigment brun. **Reactivi:** a) amestecuri fixatoare de formaldehidă-bicromat de potasiu; 1. fixator Orth: bicromat de potasiu 2,5 g; sulfat de sodiu 1 g; apă distilată 100 ml; în momentul folosirii se va adăuga 10 ml formol 40%; 2. fixator Lillie (formol-bicromat acid): se dizolvă 3 g bicromat de potasiu la 100 ml apă distilată care conţine 5% acid acetic; în momentul folosirii se adaugă 10 ml formaldehidă 40%; b) amestec cromat-bicromat: bicromat de potasiu 5%, 10 ml; cromat de potasiu 5%, 1 ml. **Tehnica de lucru:** 1. fixarea într-un amestec de formalde-

Scanned with OKEN Scanner

hidă-bicromat de potasiu; fragmente foarte mici sînt fixate imediat după moarte, într-un amestec de formaldehidă-bicromat de potasiu (b) timp de 36—42—72 ore, în funcție de natura țesutului. 2. fixarea în formaldehidă apoi post-cromizare: se fixează fragmente mici în formol-calciu Baker; fragmentele sînt introduse în amestecul cromat-bicromat de potasiu (b) timp de 24—48 ore; se spală în apă distilată și se secționează la gheață; secțiunile se spală în apă distilată și se montează în glicerogel; se pot include în parafină sau carbowax, se secționează la 5 microni, se clarifică și se montează în balsam. **Rezultat:** granulațiile enterocromafine și granulațiile țesuturilor carcinoide secretoare se colorează în brun.

Metoda cu fluorescență pentru serotonină. **Principiu:** după fixarea în formol sau vapori de formaldehidă, granulațiile de hydroxy-5 triptamină, examinate în lumina ultravioletă, prezintă o fluorescență galben-aurie caracteristică. **Tehnica de lucru:** 1. piesele fixate în orice fixator pe bază de formol, lipsite de alcool, tamponat sau nu, ca de exemplu fixator Baker, sînt secționate prin congelare sau la parafină; secțiunile sînt montate în mediu nefluorescent ca de exemplu fluor liber și sînt examinate la lumină ultravioletă; 2. o metodă ameliorată de către F u x e și J o n s s o n; metoda utilizează formaldehidă în grade de umiditate variabile, ceea ce permite o localizare mai bună a granulațiilor de serotonină și ameliorează intensitatea fluorescenței; piesele proaspete sînt imediat congelate în propan răcit în azot lichid, apoi sînt criodesicate și supuse acțiunii vaporilor de formol, la grade variabile de umiditate, la o temperatură de 80°C.

Scanned with OKEN Scanner

Autori nu au putut stabili un grad optim de umiditate a formaldehidei, condiţiile care influenţează rezultatele pot varia de la un laborator la altul, mai ales în funcţie de modalitatea de criodesicare. Ei recomandă să se folosească diferite grade, astfel: formaldehida de 70, 90, 97,5% timp de 1—6 ore, formaldehida de 70% de o oră, urmat de un tratament cu formaldehidă de 90 sau 97,7% timp de 1—2 ore, formaldehida de 90% timp de o oră urmat de un tratament cu formaldehidă 97,5% timp de 1—2 ore; după acest tratament fragmentele sînt incluse la vid în parafină, secţionate ca în metoda fluorescenţei după F a l c k pentru nervii adrenergici. **Notă:** gradul de umiditate al formaldehidei este obţinut introducînd formol într-un desicator care conţine o soluţie apoasă de acid sulfuric de densitate variabilă. **Rezultat:** granulaţiile de serotonină au o fluorescenţă galben-aurie.

Reacţia cu thioindoxyl alcalin (după P e a r s e). **Principiu:** thioindoxylul se cuplează în mediu alcalin cu hydroxy-5 tryptamina şi dă un compus de culoare brun-roşu. **Reactivi:** thioindoxyl alcalin (se va prepara înainte de folosire) se dizolvă metyl-4 cloro-6 thioindoxyl 15 mg în acetonă 2 ml, la care se adaugă picătură cu picătură tampon Tris 0,2 M pH 8,5, 35 ml; dacă soluţia este tulbure se adaugă acetonă picătură cu picătură, pînă la clarificare; se filtrează înainte de folosire. **Tehnica:** piesele se fixează în formol neutralizat tamponat sau în formol-alcalin Baker şi se secţionează la parafină; 1. secţiunile se oxidează într-o soluţie de iodat de potasiu 2,5% la 50°C (sau intr-o soluţie 5% de iod în alcool 95°), timp de 10 minute; 2. spălare în apă (dacă se utilizează alcool iodat se vor introduce secţiunile în hiposulfit de sodiu 5% timp de 2 minute); 3. se incubează în-

Scanned with OKEN Scanner

tr-o soluție alcalină de thioindoxyl (a) timp de 30 minute la 56°C, sau 2—4 ore la 37°C; 4. spălare în apă; 5. se colorează nucleii cu hemalaun; 6. alcooluri, xilen și montare în balsam. **Rezultat:** granulațiile de serotonină se colorează în brun-roșu.

Tehnica pentru histamina mastocitelor, (după Lagunoff). **Principiu:** histamina mastocitelor este păstrată prin criodesicare cuplată cu o fixare prin vapori de formaldehidă, iar apoi evidențierea cu ajutorul uneia din următoarele 3 procedee: reacții de diazotare, reacții de reducere și fluorescență. **Tehnica:** piese mici, proaspete sînt congelate imediat în izopentan sau în amestec de izopentan-pentan răcit în azot lichid, apoi sînt criodesicate la —30°—40°C. După deshidratare, piesele sînt trecute într-un desicator care conține paraformaldehidă cu clorură de calciu; capacul desicatorului este gresat pentru a obține o închidere ermetică, se va face vid parțial și desicatorul este pus într-o etuvă la 55—60°C timp de 4—96 ore; după fixare fragmentele sînt incluse la vid în parafină, la 58°C timp de 15—30 minute, apoi sînt secționate la 5 microni. Evidențierea histaminei se poate face apoi în mai multe moduri:

Reacții de diazotare. a) o sare de diazoniu stabilizată: colorarea în roșu-brun cu „Fast Black K", în galben-orange cu „Fast Garnet GBC", aceste săruri se vor utiliza în soluții de 0,5% în tampon borat pH 7,8 la 0°C; b) o soluție de p. bromoanilină proaspăt diazotată, care colorează histamina în orange strălucitor: se amestecă 3 ml dintr-o soluție apoasă 5% de p. bromoanilină în acid clorhidric 1 N cu 3 ml dintr-o soluție apoasă 5% de nitrit de sodiu, aceste soluții se răcesc la 0°C și se lasă în contact timp de 1 minut; apoi se adaugă 3 ml din-

Scanned with OKEN Scanner

tr-o soluție răcită de carbonat disodic 2,5%; secțiunile se incubează în această soluție timp de 10—15 minute.

Reacții de reducere: a) se poate face o reducere cu fericianură ferică, care dă o colorație albastră-verde (vezi pag. 287); b) se poate reduce cu argint-metenamină la o temperatură de 60°C și care dă o colorație neagră (vezi pag. 104).

Fluorescența. Secțiunile sînt examinate la lumina ultravioletă, fără deparafinare sau prin acoperirea preparatului cu ulei mineral nefluorescent.

Metoda lui Juhlin și Shelley. **Tehnica de piese congelate:** 1. se congelează fragmente de 1—10 mm grosime în izopentan răcit cu un amestec de alcool și gheață carbonică (—70°C) și se ține 15 minute (fragmentele pot fi conservate în acest lichid mai multe zile); 2. se usucă rapid cu hîrtie de filtru care se așază pe gheața carbonică; 3. se secționează la criostat la —25°C la o grosime de 10—20 microni; 4. în criostat, se acoperă preparatul cu o soluție de O-ftalaldehidă 1% în xilen răcit; se menține 30 secunde la temperatura laboratorului, se elimină xilenul; 5. se montează în alcool tetrahydrofurfurylic; 6. se examinează la ultraviolete în 10 minute. **Notă:** se face o secțiune martor acoperită numai cu xilen, pentru a elimina fluorescența. **Tehnica pe piese criodisecate:** 1. se congelează fragmente tisulare în izopentan răcit cu azot lichid; 2. după 5 minute se montează rapid sub o picătură de soluție Tyrode (a), pe port-obiectul criostatului la —25°C; 3. se secționează la criostat la —25°C, la 16 microni și se trece într-un desicator răcit cu un amestec de metanol și gheață carbonică; 4. se usucă la un vid de 0,2 mm mercur timp de 5 minute; se scot secțiunile, se lasă să se echilibreze temperatura și se pune sec-

Scanned with OKEN Scanner

țiunea într-o placă Petri; se acoperă cu o soluție 1% O-ftalaldehidă în xilen sau în eter și se lasă timp de 90 secunde. Pentru a se menține o umiditate convenabilă pe fundul plăcii Petri se pune o hîrtie de filtru umedă; 6. se usucă și se examinează ca și precedenta în 5 minute. **Rezultat:** histamina mastocitelor emite o fluorescență gălbuie.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL XII

APLICAREA REACȚIILOR HISTOCHIMICE LA STUDIUL UNOR PRODUSE PATOLOGICE

A. SUBSTANȚA AMILOIDĂ

Cu toate tehnicile și studiile făcute asupra amiloidului nici pînă astăzi nu i se cunoaște exact compoziția. Histologic apare ca o materie omogenă, anhistă, insolubilă în apă, alcool, eter, acizi diluanți, iar cînd este abundentă are aspect striat. Substanța amiloidă este un complex glucido-proteic cu caracter slab acid, conține o fracțiune polizaharidică neutră de natură neglicogenică.

Histochimic există, în principiu, patru reacții specifice ale amiloidului: Reacția cu iod; Colorarea cu roșu de Congo; Fluorescența după tratarea cu thiofulvină; Metacromazia cu cristal violet.

Reacția cu iod a fost introdusă de către Virchov, fără a fi însă specifică. **Principiu:** colorarea în brun-mahon a soluției amiloide cu iodul comparabil cu cea a glicogenului. **Fixarea:** în formol sau etanol, secțiuni la gheață sau parafină.

Procedeul Mallory pentru examen imediat. **Reactivi:** a. soluția iodată: se diluează 1 ml din sol. Weigert în 99 ml apă dist.; b. soluția Weigert: iod 1 g; iodură de potasiu 2 g, apă dist. 100 ml. **Tehnica:** 1. colorare cu sol. iodată timp de 10—15 min.;

Scanned with OKEN Scanner

2. spălare în apă; 3. examinare imediată în apă sau glicerină.

Procedeul Langhans pentru preparate permanente. **Reactivi:** a) sol. de carmin: carmin 1 g; alaun de potasiu 4 g; apă dist. 100 ml. Se fierbe la foc mic timp de 15—20 min. Se răcește și se filtrează, apoi se adaugă 1 g de timol pentru conservat; b) sol. Gram: iod 1 g, iodură de potasiu 2 g; apă dist. 300 ml. **Tehnica:** 1. colorare cu carmin timp de 10—15 min.; 2. colorarea secțiunilor cu sol. Gram timp de 5—10 min.; 3. deshidratare în etanol absolut care conține 1—2% iod cristale; 4. xilen I și II; montare în ulei de origan. **Rezultat:** amiloidul se colorează brun-mahon; pentru a obține rezultate bune pe țesuturile recoltate din autopsii, este necesar ca înainte de colorare cu iod să se treacă piesa printr-o soluție de acid acetic 1%.

Metoda cu soluții apoase sau alcaline de roșu de Congo. Fixatorii ideali sînt: alcoolul absolut, amestecul Carnoy. Secționarea se preferă să se facă prin congelare. Fixarea în formol poate da rezultate bune dacă secțiunea se supune unei pretratări cu o sol. alcoolică alcalină.

Metoda cu soluție apoasă [de roșu de congo (după Bennhold). **Tehnica:** 1. colorarea cu sol. apoasă de roșu de Congo 1% timp de 10—30 min.; 2. trecerea printr-o soluție apoasă saturată de carbonat de litiu timp de 15 sec.; 3. decolorarea în etanol 80° pînă cînd s-a eliminat excesul de colorant; 4. spălarea în apă de robinet timp de 15 min.; 5. colorarea nucleilor cu hemalaun; 6. spălare în apă; 7. deshidratare, clarificare, montare în balsam.

Metoda cu roșu de congo alcalin, (după Puchtler, Sweet și Levine). **Soluții:** sol. de etanol alcalin: etanol 80% saturat cu clorură de sodiu

50 ml la care se adaugă: sol. apoasă 1% de sodă 0,5 ml. Se filtrează și se întrebuințează imediat (cel mult 15 min. după preparare). Roșu de Congo alcalin: sol. mamă: etanol 80% saturat cu roșu de Congo și clorură de sodiu. Sol. de lucru: în momentul întrebuințării se adaugă la 50 ml sol. mamă 0,5 ml dintr-o sol. apoasă de 1% de sodă. Se filtrează și sol. se va întrebuința la 15 min. după prepararea ei. **Tehnica:** 1. colorare cu hemalaun timp de 10 min.; 2. clătire în 3 băi de apă dist.; 3. trecerea într-o sol. de etanol saturat cu clorură de sodiu timp de 20 min.; 4. colorarea în sol. alcalină de roșu de Congo timp de 20 min.; 5. deshidratare rapidă în 3 băi de etanol absolut; clarificare în 2 băi de xilen; montare în DPX. **Rezultat:** amiloidul se colorează în roz-viu spre roșu, la microscopul polarizant: birefringență intensă și dicroism. La microscopul cu ultraviolete: fluorescență roșie.

TEHNICA DE COLORARE CU CRISTAL VIOLET

(vezi de aceiași autori „Tehnici de histologie normală și patologică" Editura Ceres, 1974, pag. 262).

VARIANTA LUI BACROFT (idem pag. 263).

METODA ARGENTICĂ (după King). **Principiu:** colorația empirică și nespecifică a substanței amiloide printr-o metodă derivată din procedeul cu carbonat de argint al lui Del Rio Hortega. **Reactivi:** sol. amoniacală de argint; a) sol. mamă: se adaugă picătură cu picătură amoniac concentrat la 5 ml sol. apoasă 10% azotat de argint pînă cînd precipitatul brun format la început foarte puțin, se dizolvă; se adaugă apoi 6—8 ml dintr-o sol. apoasă 3,5% carbonat de sodiu și se diluează cu 75 ml apă distilată. Sol. se păstrează la întuneric și la rece; b) sol. de lucru: în momentul folosirii se adaugă 10 ml sol. mamă, cîteva picături de piridină. **Tehnica:** se aplică pe secțiuni

Scanned with OKEN Scanner

la gheață, pe piese fixate în formol. Secțiunile se spală în apă dist.: 1. secțiunile cu ajutorul unei baghete de sticlă, se introduc în sol. amoniacală de argint și se agită ușor, încălzită în jur de 45°C pînă cînd secțiunile prind o tentă brună-tabac; 2. se trec într-o sol. apoasă 5% hiposulfit de sodiu și lăsăm să acționeze 2—4 min.; 3. spălare cu atenție în apă în 3—4 reprize; 4. secțiunile se prind pe lamă și se usucă cu sugativă; 5 . colorarea fondului cu safranină sau roșu nuclear; 6. deshidratare în alcooluri, xilen I și II; montare în balsam sau DPX. **Rezultat:** amiloidul apare în brun-negru pînă la negru; la fel se colorează nucleii, pigmenții lipoidici; în brun deschis cilindrii hialini din rinichi, colagenul și citoplasmele.

Metoda iod-clorură de aur, **(după Lynch și Inwood).** (vezi lucrarea citată anterior pag. 263).

B. FIBRINOIDUL ȘI FIBRINA

În baza cunoștințelor actuale, „fibrinoidele" sînt considerate modificări survenite în circumstanțele patologice. Ele nu au un substrat morfologic, biochimic, histochimic și ultrastructural comun, dar diferențierea în fibrinoid conjunctiv și fibrinoid vascular corespunde mecanismelor de formare diferite. Din punct de vedere histochimic, fibrinoidul intravascular are constituenți proteici, glucidici și lipidici, în timp ce fibrinoidul conjunctiv nu conține fracțiuni lipidice. În ambele tipuri de fibrinoid reacțiile pentru proteine sînt pozitive, iar pentru glucide (polizaharide sau mucoproteine) reacția PAS este intens pozitivă.

Scanned with OKEN Scanner

PROCEDEELE DE FIXARE ALE FIBRINEI (după Lendrum şi col.). A. Piese proaspete: 1. fixare în formol-sublimat timp de 10—12 ore; 2. se trec într-o sol. apoasă 5% clorură mercurică şi se lasă un timp ce variază după ţesut (7—10 zile pentru ficat sau encefal, 2—3 săptămîni pentru rinichi; 6—8 săptămîni pentru inimă şi pulmon). B. Piese de autopsie executată la mai mult de 4 ore după moarte: 1. fixare la început în formol salin timp de 5 ore; 2. trecerea într-o sol. apoasă de 5% clorură mercurică, în continuare ca mai sus.

Degresarea secţiunilor. Coloraţiile fibrinei sînt îmbunătăţite dacă secţiunile sînt în prealabil supuse unei degresări, această operaţie se face după ce secţiunile sînt trecute în xilen pentru deparafinare; 1. clătirea secţiunii în tricloracetilen, apoi le punem într-un recipient închis care conţine tricloretilen timp de 48 ore; 2. clătire în etanol absolut; 3. spălare în apă.

PROCEDEUL ZIS „PICRO-MALLORY" pentru fibrină, vezi de aceiaşi autori „Tehnici de histologie normală şi patologică" Editura Ceres, 1974, pag. 275.

PROCEDEUL ZIS „MASSON 44/41" PENTRU FIBRINĂ, (după Lendrum). **Principiu:** colorarea fibrinei în albastru-negru printr-un colorant acid „naphtalene blue black CS" (acid black 41) asociat cu o colorare a nucleilor cu albastru celestin şi hemateină şi, citoplasmele şi diferenţierea structurilor printr-un colorant acid-roşu. **Tehnica:** 1. se deparafinează secţiunile în xilen; 2. clătire în tricloretilen şi scufundarea în tricloretilen într-un vas ermetic închis, se lasă 48 ore; 3. clătire în etanol absolut şi se pun într-un flacon bine închis în etanol absolut saturat cu acid picric şi conţinînd 3% clorură mercurică

Scanned with OKEN Scanner

timp de 3 ore; 4. spălare în apă, trecerea în iod (etanol 80° 100 ml + iod 0,5 g) și hiposulfit (pentru îndepărtarea precipitatelor mercurice) și spălare în apă pînă dispare tenta galbenă dată de acidul picric; 5. colorarea nucleilor ca în metoda precedentă (timpii 1—3), se clătește în apă; 6. diferențierea în acid clorhidric 0,25% în etanol 70° și se spală bine în apă; 7. colorarea într-o sol. de „brilliant crystal scarlet 6R" (naphtalene scarlet 4RS, acid red 44) 1% în acid acetic timp de 5 min., clătire în apă; 8. trecerea într-o sol. apoasă 1% acid fosfotungstic timp de 5 min., clătire în apă; 9. colorarea în „naphtalene blue blak CS (acid black 41) 1% în acid acetic 1% timp de 30 min., clătire în apă; 10. alcool 95° apoi absolut, xilen I, II montare în butilftalat stiren. **Rezultat:** fibrina = depozitele vechi se colorează intens albastru-negru (la fel depozitele fibrinoide intravasculare); depozitele recente se colorează în roșu-închis (căci el fixează puțin colorant roșu), colagenul = albastru palid; nucleii = albastru-negru, celulele enterocromafine = roșii.

Procedeul zis „yellosolve I" pentru fibrină, (după Lendrum). **Principiu:** colorarea fibrinei în roșu cu floxină, asociată cu o coloraţie nucleară cu albastru celestin-hemalaum sau hemalaum singur și o colorare a colagenului cu un colorant acid galben (Lissamine flavine FFS sau galben acid 7 sau ferrazo yellow). **Tehnica:** 1. deparafinare și tratarea secțiunilor cu tricloretilen timp de 24—48 ore (vezi procedeul Masson 44/41 timpii 1 și 2); 2. colorarea nucleilor cu albastru celestin apoi cu hemalaun sau numai cu hemalaun, spălare cu apă; 3. colorare cu o sol. de floxină 0,5% (în apă care conține 0,5% clorură de calciu) timp de 30 min.; 4. clătire în cello-

Scanned with OKEN Scanner

solv apoi în tetracloretilen şi lăsăm într-o baie de tetracloretilen pînă a doua zi; 5. clătire în cellosolv; 6. diferenţiere într-o sol. saturată de lisamin-flavin FFS într-un amestec de cellosolv şi fosfat de etil (1 : 1), în final o diferenţiere la microscop; se clătesc în cellosolv apoi se trec prin xilen şi se montează în butilftalat stiren. **Rezultat:** fibrina = roşu; nucleii = albastru-negru; colagenul = galben.

METODA WEIGERT CU VIOLET DE METIL (vezi de aceiaşi autori „Tehnici de histologie normală şi patologică" Editura Ceres, 1974, pag. 275).

METODA MALLORY CU HEMATOXILINĂ FOSFOTUNGSTICĂ (vezi idem, pag. 276).

C. PATOLOGIA METABOLISMULUI LIPIDIC; DEGENERESCENŢA MIELINICĂ, DISLIPIDOZE

DEGENERESCENŢA MIELINICĂ

Mielina normală are o structură lamelară, formată din molecule lipidice dispuse radiar, care alternează cu molecule proteice dispuse circumferenţial.

Degenerescenţa mielinică se traduce iniţial prin fisurarea lamelor lipoproteice, apoi se ajunge la o fragmentare completă a tecii. Printr-un fenomen de „lipofaneroză degenerativă" vor apare lipide hidrofobe. Evidenţierea acestor grăsimi se poate face cu coloranţi de tipul roşului de Sudan şi reacţia tetraoxidului de osmiu sau reacţia Schultz, care este special adaptată pentru colesteride.

METODA CU LIZOCROMI. **Principiu:** metodele se bazează pe faptul că mielina normală nu se colorează cu lizocromi, în timp ce mielina degerenată fixează aceşti coloranţi. Pentru a se obţine contrast se colo-

Scanned with OKEN Scanner

rează mielina normală cu o hematoxilină sau cu „luxol fast blue". **Reactivi:** a) sol. de hematoxilină (se face amestecul înainte de folosire) sol. apoasă sau alcoolică 1% de hematoxilină (mai veche de 5 zile) 50 ml. sol. apoasă 4% alaun de fier 50 ml; b) borax-fericianură de potasiu: borax ($Na_2B^4O_7$, $10H_2O$), 1 g; fericianură de potasiu 2,5 g; apă 100 ml; c) Sudan II: sol. saturată de Sudan II în alcool izopropilic (99%) 30 ml; apă dist. 20 ml; se lasă în repaus 10 min., se filtrează. Această sol. trebuie să fie folosită în 3—4 ore de la preparare; d) Luxol fast blue (pag. 329). **Tehnica:** procedeul cu hematoxilină-Sudan II: 1. se colorează în sol. de hematoxilină în recipient închis, la 56° timp de 40 min.; clătire în apă dist.; 2. diferențiere într-o sol. apoasă 0,5% alaun de fier timp de 1 oră, clătire în apă; 3. diferențiere în borax-fericianură de potasiu 10 min.; 4. colorare în sol. Sudan II timp de 10—20 min.; spălare în apă; 5. montare în sirop Aphaty.

PROCEDEUL CU „LUXOL FAST BLUE" – OIL RED O": 1. trecerea rapidă în etanol de 50° apoi 70°; 2. colorarea cu luxol fast blue timp de 3 ore la temp. laboratorului; 3. clătire rapidă în etanol 70° apoi 50°; 4. trecere în apă dist. timp de 30 sec.; 5. începerea diferențierii prin trecere într-o sol. apoasă de 0,05% carbonat de litiu timp de mai puțin 20 sec.; 6. continuarea diferențierii în alcool de 70° pînă cînd se pot distinge net substanțele albe și cenușii, în jur de 30 sec.; 7. spălare cu apă dist. și examinare la microscop. Dacă diferențierea este insuficientă se repetă timpul 5 și 7 dar reducînd timpii (2—3 sec. pentru timpul 5); 8. colorare cu oil red 0 după Lillie și Ashburn. **Rezultat:** a) procedeul cu hematoxilină-Sudan II: mielină normală = albastru-negru; mielina degenerată = roșu-orange; b) proce-

Scanned with OKEN Scanner

deul Luxol fast blue — oil red 0: mielina naturală = albastru-verde; mielina degenerată = roşu.

Alte tehnici de evidenţiere a mielinei, vezi de aceiaşi autori „Tehnici de histologie normală şi patologică“ Editura Ceres, 1974, pag. 328—334.

DISLIPIDOZE

În cadrul acestui grup de tulburări ale metabolismului lipidic sînt cuprinse acumulări excesive de lipide în elemente reticulo-histiocitare şi în parenchimuri, fie că în mod normal nu conţin, sau conţin o cantitate neglijabilă de lipide. În general patologiştii s-au obişnuit a diferenţia infiltraţia grasă, ca o depozitare pasageră de lipide în celule şi fără a determina necrobioza, faţă de degenerescenţa propriu-zisă, cînd excesul de lipide determină tulburări locale (necrobioză) şi influenţează starea generală a organismului.

Tehnici de lucru: vezi capitolul IX, „Lipidele“.

D. PATOLOGIA METABOLISMULUI MUCOPOLIZAHARIDELOR

În literatura de specialitate, grupul bolilor produse în urma perturbărilor metabolismului mucopolizaharidelor sînt cunoscute sub numele de „mucopolizaharidoze“. Un loc tot mai important îl ocupă mucopolizaharidozele congenitale. În principiu se produce o acumulare de diverse tipuri de mucopolizaharide în celulele fibroblaste, celulele nervoase, reticulare parenchimatoase sau epiteliale. Prezenţa substratului mucopolizaharidic nu poate fi dovedită decît prin metode histochimice.

Scanned with OKEN Scanner

E. STUDIUL HISTOCHIMIC AL PRODUȘILOR DE CATABOLISM

Acidul uric și derivații săi. Acești produși dau reacția de bazofilie numai la un pH de aproximativ 4; bazofilia fiind ortocromatică, identificarea este ușoară.

METODA CU XANTHYDROL, PENTRU UREE. **Principiu:** ureea se combină cu xanthydrolul pentru a forma un precipitat de dixanthyluree, care cristalizează sub formă de ace fine, grupate sub formă de rozetă, insolubile în apă, alcool, eter, toluen, xilen, acid acetic glacial, dar sînt distruse în toluenul fenicat.

METODA OLIVER. **Tehnica:** piese mici se introduc pentru 6—12 ore într-o sol. de 6 g xanthydrol într-un amestec de 35 ml alcool absolut și 65 ml acid acetic cristalizabil (se va utiliza xanthydrol poaspăt, se va prepara sol. în momentul utilizării, pentru dizolvarea totală a xanthydrolului se va încălzi ușor, apoi după răcire se filtrează) deshidratarea, includerea în parafină și secționarea se vor face fără nici o precauțiune; se poate face o colorație de fond. Cristalele de uree se pot identifica cel mai ușor în lumina polarizată; la microscopul optic, cristalele apar colorate în galben-verzui sau uneori bruniu.

REACȚII PENTRU PURINE

Rezultatele cele mai bune se obțin după fixarea în alcool-formolat sau fixator Carnoy, urmată de includerea în parafină. În momentul întinderii sec-

Scanned with OKEN Scanner

țiunilor pe lamă, vom avea grijă ca apa să nu fie prea caldă, sau mai bine prin procedeul uscat.

TEHNICA CU ARGINT — HEXAMETILEN-TETRAMINĂ (după Gomori). **Tehnica:** 1. secțiunile la parafină, provenite de la piese fixate în alcool, alcool-formolat sau Carnoy, deparafinate, se spală în alcool absolut. 2. din alcool absolut secțiunile se trec în sol. de argint hexametilen-tetramină tamponată la pH 8—9 (pag. 104), în prealabil încălzită la 37°, se țin timp de 30 min.; 3. clătire în apă dist.; 4. clătire rapidă în sol. de 5% tiosulfat de sodiu; 5. clătire în apă de robinet; 6. se va vira eventual în clorură de aur, sol. apoasă 0,2% neacidificată; 7. clătire în apă dist.; 8. colorare, eventual a nucleilor (safranină, fuxină bazică etc.); 9. deshidratare în alcool absolut, clarificare în benzen, montare în balsam. **Rezultat:** depozitele de urați au o tentă intensă, singura eroare poate fi dată de către depozitele de calciu.

IMPREGNAREA ARGENTICĂ A URAȚILOR (după Galantha). **Tehnica:** 1. secțiunile provenite de la material fixat în lichid Carnoy sau alcool absolut sînt deparafinate și introduse în alcool absolut; 2. se trec direct în sol. apoasă 20% azotat de argint, se expun la lumină solară la o sursă bogată în raze ultraviolete timp de 1—4 ore (cristalele de urați vor primi o tentă roză); 3. secțiunea se acoperă, pentru scoaterea nitratului de argint cu următoarea sol. preparată extemporaneu: sol. apoasă 3% de gelatină încălzită la 60° 10 ml; sol. apoasă 20% de azotat de argint 3 ml; sol. apoasă 2% de hidrochinonă 2 ml; se lasă să acționeze pînă cînd cristalele de urați primesc o tentă neagră, țesutul conjunctiv rămîne galben-clar; 4. secțiunile se spală abundent în apă dist., încălzită cam la 60°; 5. se deshidra-

Scanned with OKEN Scanner

tează în alcool absolut, se clarifică în benzen și se montează în balsam. **Rezultat:** cristalele de urați prind o tentă neagră pe un fond gălbui.

COLORAREA CRISTALELOR ȘI SFEROLITELOR DE ACID URIC CU CARMIN, (după Schultz și Schmidt). **Reactivi:** a) sol. de carmin: se dizolvă la fierbere 1 g carmin, 2 g clorură de amoniu și 0,5 g carbonat de litiu în 50 ml apă dist.; după răcire se adaugă 20 ml amoniac; sol. de lucru: se diluează 3 ml din sol. mamă cu 1,5 ml amoniac și 2,5 ml alcool metilic (sol. de lucru nu se poate păstra decît cîteva ore). **Tehnica:** 1. secțiunile provenite din material fixat în lichid Carnoy sau alcool absolut, sînt deparafinate și trecute în alcool absolut; 2. fără a hidrata secțiunile se vor colora în hemalaun; 3. secțiunile se acoperă cu sol. amoniacală de carmin timp de 1 min. mișcînd lama; 4. se înmoaie lama de 2 ori în alcool absolut la care s-a adăugat 0,5% acid clorhidric concentrat și se scoate imediat; 5. se tratează pînă la albăstrirea secțiunilor cu alcool absolut la care s-au adăugat 5 picături de amoniac la 50 ml; 6. se spală în alcool absolut, se clarifică și se montează. **Rezultat:** nucleii se colorează în albastru, depozitele de acid uric în roșu, uratul de sodiu rămîne incolor; glicogenul nu se colorează cu carminul, numai dacă timpul de activitate este prelungit peste necesar.

COLORAREA CRISTALELOR ȘI SFEROLITELOR DE ACID URIC CU ALBASTRU DE METILEN (după Schultz și Schmidt). **Reactivi:** a) se amestecă alcool metilic 8 volume cu amoniac 2 volume; b) se amestecă în părți egale; sol. saturată de albastru de metilen în alcool 96° cu alcool absolut; c) se pun 10 picături dintr-o sol. saturată de fucsină acidă în alcool 96°, peste 30 ml dintr-o sol. saturată de acid picric în

Scanned with OKEN Scanner

alcool absolut. **Tehnica:** 1. piesele fixate în lichid Carnoy sau alcool absolut se prelucrează obișnuit la parafină, apoi se secționează și se deparafinează și se introduc în alcool absolut, nu se vor hidrata; 2. se introduce în amestecul (a) timp de 5 min.; 3. se trec în amestecul (b) timp de 30 sec.; 4. se spală în alcool absolut pînă cînd se elimină tot excesul de albastru de metilen; 5. se tratează cu amestecul (c) timp de 15 sec.; 6. se spală în alcool absolut, se clarifică, se montează. **Rezultat:** nucleii se colorează în albastru închis, colagenul în roșu, cristalele și sferolitele acidului uric au o tentă verde-deschis.

COLORAREA CRISTALELOR DE ACID URIC ȘI A DEPOZITELOR DE URAȚI DE SODIU (după Schultz și Schmidt). **Tehnica:** 1. piesele fixate în Carnoy sau alcool absolut sînt prelucrate la parafină, apoi secționate, deparafinate și introduse în alcool absolut; 2. se scot din alcool absolut și se colorează într-o sol. amoniacală diluată de carmin; 3. se clătesc în alcool absolut la care s-a adăugat 0,5% acid clorhidric; 4. spălare în alcool absolut; 5. se colorează într-o sol. alcoolică semisaturată de albastru de metilen; 6. clătire în alcool absolut; 7. secțiunile se tratează timp de 15 sec. cu amestecul; sol. apoasă saturată de acid picric 9 volume și sol. apoasă saturată de sulfat de sodiu 1 volum; 8. clătire și deshidratare în alcool absolut; clarificare și montare. **Rezultat:** nucleii sînt colorați în albastru-cenușiu, depozitele de urați de sodiu în verde-deschis; sărurile acidului uric în albastru-verde intens.

IDENTIFICAEA ACIDULUI URIC ȘI A URAȚILOR LA PĂSĂRI (după V. Ciurea și I. Paul). **Tehnica:** 1. fragmente de țesut de 1—4 mm sînt fixate în metanol timp de 6—12 ore; 2. includere obișnuită

Scanned with OKEN Scanner

la parafină; băi de alcool amilic-parafină și parafină cîte o oră; 3. secționarea la 6 microni; 4. deparafinare; spălare în metanol 5 min.; 5. colorare cu sol. diluată de May Grünwald timp de 20 min.; 6. spălare în metanol; 7. clarificare în alcool amilic, toluol, montare. **Rezultat:** cristalele de acid uric și urați apar integral în locurile de depozitare; nucleii apar colorați în albastru palid.

CARACTERELE DIFERENȚIATOARE ÎNTRE GUANINĂ ȘI ACIDUL URIC: guanina este foarte solubilă în acizii minerali, insolubilă în acizii organici, foarte solubilă în alcali, cu excepția amoniacului și insolubilă în hidrat de piperazină, în timp ce acidul uric este insolubil în acizii minerali, solubil în alcali, cu excepția amoniacului și solubil în hidrat de piperazină. Pentru o diferențiere netă subliniem solubilitatea guaninei în soluțiile apoase de alaun de fier.

Scanned with OKEN Scanner

APPENDIX

Formulele şi greutăţile moleculare ale substanţelor utilizate la prepararea soluţiilor tampon
(după Lillie)

Substanţa	Formula chimică	Greutatea moleculară
Acetat de sodiu anhidru	CH_3COONa	82,04
Acetat de sodiu cristalizat	$CH_3COONa, 3\ H_2O$	136,09
Acid acetic	CH_3COOH	60,05
„ boric	$B(OH)_3$	61,84
„ clorhidric	HCl	36,465
„ citric anhidru	$C_3H_4OH(COOH)_3$	192,12
„ citric cristalizat	$C_3H_4OH(CCOH)_3, H_2O$	210,14
„ formic	$HCOOH$	46,03
„ maleic	$HOOCCH=CHCOOH$	116,07
„ azotic	HNO_3	63,016
„ oxalic	$(COOH)_2$	90,038
„ sulfuric	H_2SO_4	98,082
Amoniac	NH_3	17,032
Borat de sodiu (borax)	$Na_2B_4O_7, 10\ H_2O$	381,43
Clorură ferică anhidră	$FeCl_3$	162,22
Clorură ferică cristalizată	$FeCl_3, 6\ H_2O$	270,32
Clorură de potasiu	KCl	74,553
Clorură de sodiu	$NaCl$	58,448
Citrat de sodiu cristalizat	$C_3H_4OH(COONa)_3, 5,5\ H_2O$	357,18

Scanned with OKEN Scanner

(continuare)

Substanța	Formula chimică	Greutatea moleculară
Citrat de sodiu granulat	$C_3H_4OH(COONa)_3$, 2 H_2O	294,12
Veronal sodic	$C_8H_{11}O_3N_2Na$	206,18
Glicin (glicocol)	H_2NCH_2COOH	75,07
Oxalat de sodiu	$Na_2C_2O_4$	134,004
Fosfat monopotasic	KH_2PO_4	136, 09
Fosfat tripotasic	K_3PO_4	212,275
Fosfat monosodic	NaH_2PO_4,H_2O	138,01
Fosfat disodic	Na_2HPO_4	141,98
Hidroxid de potasiu	KOH	56,104
Hidroxid de sodiu	NaOH	40,005
Trihydroxymethylamino-methane (Tris)	$H_2NC(CH_2OH)_3$	121,14

Tampon acid citric-fosfat
(după Mc Ilvaine)

pH: 2,2 — 8,0
Soluție A: 0,1 m Acid citric (21,0 g $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$/1 H_2O)
Soluție B: 0,2 g fosfat disodic (35,6 g $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$/1 H_2O)

pH	Soluție A ml	Soluție B ml
2,2	98,00	2,00
2,4	93,80	6,20
2,6	89,10	10,90
2,8	84,15	15,85
3,0	79,45	20,55
3,2	75,30	24,70
3,4	71,50	28,50
3,6	67,80	32,20
3,8	64,50	35,50
4,0	61,45	38,55
4,2	58,60	41,40

Scanned with OKEN Scanner

(continuare)

pH	Soluţie A ml	Soluţie B ml
4,4	55,90	44,10
4,6	53,25	46,75
4,8	50,70	49,30
5,0	48,50	51,50
5,2	46,40	53,60
5,4	44,25	55,75
5,6	42,00	58,00
5,8	39,55	60,45
6,0	36,85	63,15
6,2	33,80	66,10
6,4	30,75	69,25
6,6	27,25	72,75
6,8	22,75	77,25
7,0	18,15	81,85
7,2	13,05	86,95
7,4	9,15	90,85
7,6	6,35	93,65
7,8	4,30	95,70
8,0	2,75	97,25

Tampon fosfat
(după Sorensen)

pH: 5,0 — 8,2
Soluţie A: 1/15 M fosfat monopotasic (9,08 g KH_2PO_4/1 H_2O)
Soluţie B: 1/15 M fosfat disodic-2-hidratat (11,88 g $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$/1 H_2O)

pH	Soluţie A ml	Soluţie B ml
5,0	98,8	1,2
5,2	98,0	2,0
5,4	96,7	3,3
5,6	94,8	5,2
5,8	91,9	8,1

Scanned with OKEN Scanner

(continuare)

pH	Soluţie A ml	Soluţie B ml
6,0	87,7	12,3
6,2	81,5	18,5
6,4	73,2	26,8
6,6	62,7	37,3
6,8	50,8	49,2
7,0	39,2	60,8
7,2	28,5	71,5
7,4	19,6	80,4
7,6	13,2	86,8
7,8	8,6	91,4
8,0	5,5	95,4
8,2	3,3	96,7

Tampon citrat (I)
(după S o r e n s e n)

pH: 2,2 — 4,8
Soluţie A: 0,1 M citrat disodic (21,0 g acid citric-1-hidratat în 200 ml 1 N NaOH ad 1000 apă dist.)
Soluţie B: 0,1 N HCl

pH	Soluţie A ml	Soluţie B ml
2,2	33,0	67,0
2,4	34,6	65,4
2,6	36,4	63,6
2,8	38,4	61,6
3,0	40,5	59,5
3,2	42,8	57,2
3,4	46,0	54,0
3,6	48,5	51,5
3,8	52,0	48,0
4,0	55,8	44,2
4,2	61,2	38,8
4,4	67,8	32,3
4,6	76,6	23,4
4,8	88,2	11,8

Scanned with OKEN Scanner

Tampon citrat (II)
(după Horecker—Lillie)

pH: 2,86 — 7,60
Soluţie A: 0,1 M acid citric (21,0 g $C_6H_8O_7 \cdot 1\ H_2O$/1 H_2O)
Soluţie B: 0,1 M tricitrat de sodiu-2-hidratat
(29,4 g $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2\ H_2O$/1 H_2O)

pH	Soluţie A ml	Soluţie B ml
2,86	20	0
2,95	19	1
3,08	18	2
3,23	17	3
3,40	16	4
3,58	15	5
3,80	14	6
4,01	13	7
4,27	12	8
4,50	11	9
4,65	10	10
4,84	9	11
5,04	8	12
5,26	7	13
5,50	6	14
5,74	5	15
5,97	4	16
6,17	3	17
6,42	2	18
6,77	1	19
7,60	0	20

Scanned with OKEN Scanner

Tampon citrat (III)

(după S o r e n s e n)

pH: 5,0 — 6,8

Soluţie A: 0,1 M citrat disodic (21,0 g acid citric-1-hidratat în 200 ml 1 N NAOH ad. 1000 ml apă distilată).

Soluţie B: 0,1 N NaOH

pH	Soluţie A ml	Soluţie B ml
5,0	96,3	3,7
5,2	85,0	15,0
5,4	76,5	23,5
5,6	69,3	30,7
5,8	63,3	36,7
6,0	59,5	40,5
6,2	56,7	43,3
6,4	54,5	45,5
6,6	53,0	47,0
6,8	51,8	48,2

Tampon cu acid acetic

(după W o l o l e)

pH: 3,6 — 5,6

Soluţie A: 0,2 M acid acetic

Soluţie B: 0,2 M acetat de sodiu

(16,4 g $C_2H_3O_2Na$ sau 27,2 g $C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$/1 H_2O)

pH	Soluţie A ml	Soluţie B ml
3,6	46,3	3,7
3,8	44,0	6,0
4,0	41,0	9,0
4,2	36,8	13,2
4,4	30,5	19,5
4,6	25,5	24,5
4,8	20,0	30,0
5,0	14,8	36,2

Scanned with OKEN Scanner

(continuare)

pH	Soluţie A ml	Soluţie B ml
5,2	10,5	39,5
5,4	8,8	41,2
5,6	4,8	45,2

Se completează ad. 250 ml cu apă distilată

Tampon cu glicină (I)
(după Sorensen)
pH: 1,2 — 3,6
Soluţie A: 0,1 M Glycin în 0,1 N NaCl
(7,5 g $C_2N_5NO_2$ + 5,85 g NaCl/1 H_2O)
Soluţie B: 0, N HCl

pH	Soluţie A ml	Soluţie B ml
1,2	15,0	85,0
1,4	28,7	71,3
1,6	38,2	61,8
1,8	45,7	54,3
2,0	52,3	47,7
2,2	58,3	41,7
2,4	64,5	35,5
2,6	70,2	29,8
2,8	75,6	24,4
3,0	80,8	19,2
3,2	85,6	14,4
3,4	90,3	9,7
3,6	94,5	5,5

Scanned with OKEN Scanner

Tampon cu glicină (II)
(după Sorensen)
pH: 8,4 — 13,0
Soluție A: 0,1 M Glycin în 0,1 N NaCl
(7,5 g $C_2H_5NO_2$ + 5,85 g NaCl/1 H_2O)
Soluție B: 0,1 N NaOH

pH	Soluție A ml	Soluție B ml
8,4	96,5	3,5
8,6	94,8	5,2
8,8	92,1	7,9
9,0	88,5	11,5
9,2	84,2	15,8
9,4	79,0	21,0
9,6	73,2	26,8
9,8	67,7	32,3
10,0	63,0	37,0
10,2	59,0	41,0
10,4	56,1	43,9
10,6	53,7	46,3
10,8	52,2	47,8
11,0	51,0	49,0
11,2	50,3	49,7
11,4	49,7	50,3
11,6	48,8	51,2
11,8	47,8	52,2
12,0	46,2	53,8
12,2	43,6	56,4
12,4	40,0	60,0
12,6	33,4	66,6
12,8	24,2	75,8
13,0	7,5	92,5

Scanned with OKEN Scanner

Tampon tris-maleat

(după G o m o r i)

pH: 5,2 — 8,6

Soluţie A: 0,2 M tris-maleat (24,2 g tris-(hydroxy-methyl)-amino-methan + 23,2 g acid maleic/1 H_2O)

Soluţie B: 0,2 N NaOH

pH	Soluţie A ml	Soluţie B ml
5,2	25	3,5
5,4	25	5,4
5,6	25	7,8
5,8	25	10,3
6,0	25	13,0
6,2	25	15,8
6,4	25	18,5
6,6	25	21,3
6,8	25	22,5
7,0	25	24,0
7,2	25	25,5
7,4	25	27,0
7,6	25	29,0
7,8	25	31,8
8,0	25	34,5
8,2	25	37,5
8,4	25	40,5
8,6	25	43,3

Scanned with OKEN Scanner

Tampon tris-HCl

(după G o m o r i)
pH : 7,2 — 9,0
Soluţie A : 0,2 M tris-(hydroxy-methyl)-amino-methan (24,2 g $C_4H_{11}N\ O_3$/1 H_2O)
Soluţie B : 0,2 N HCl

pH	Soluţie A ml	Soluţie B ml
7,2	22,1	77,9
7,4	20,7	79,3
7,6	19,2	80,8
7,8	16,3	83,7
8,0	13,4	86,6
8,2	11,0	89,0
8,4	8,3	91,7
8,6	6,1	93,9
8,8	4,1	95,9
9,0	2,5	97,5

Tampon clorură de potasiu-acid clorhidric

(după C l a r k şi L u b s)
pH 1,0 — 2,2
Soluţia A : 0,2 N KCl (14,9 g KCl/1 H_2O)
Soluţia B : 0,2 N HCl

pH	Soluţie A ml	Soluţie B ml
1,0	25	48,50
1,2	25	32,25
1,4	25	20,75
1,6	25	13,15
1,8	25	8,40
2,0	25	5,30
2,2	25	3,35

25 ml A + x ml B şi pînă la 100 ml apă distilată.

Scanned with OKEN Scanner

Tampon cu cacodilat

(după P l u m e l)

pH: 5,0 — 7,4

Soluţie A: 0,2 M cacodilat de sodiu (42,8 g $Na(CH_3)_2AsO_2 \cdot 3\ H_2O$/1 H_2O)

Soluţie B: 0,2 N HCl

pH	Soluţie A ml	Soluţie B ml
5,0	25	23,5
5,2	25	22,5
5,4	25	21,5
5,6	25	19,6
5,8	25	17,4
6,0	25	14,8
6,2	25	11,9
6,4	25	9,2
6,6	25	6,7
6,8	25	4,7
7,0	25	3,2
7,2	25	2,1
7,4	25	1,4

Se completează ad. 100 ml cu apă distilată.

Tampon veronal

(după M i c h a e l i s)

pH: 6,8 — 9,6

Soluţie A: 0,1 M veronal (barbital sodic) (20,6 g $C_8H_{11}N_2NaO_3$/1 H_2O)

Soluţie B: 0,1 N HCl

pH	Soluţie A ml	Soluţie B ml
6,8	52,2	47,8
7,0	53,6	46,4
7,2	55,4	44,6

Scanned with OKEN Scanner

(continuare)

pH	Soluţie A ml	Soluţie B ml
7,4	58,1	41,9
7,6	61,5	38,5
7,8	66,2	33,8
8,0	71,6	28,4
8,2	76,9	23,1
8,4	82,3	17,7
8,6	87,1	12,9
8,8	90,8	9,2
9,0	93,6	6,4
9,2	95,2	4,8
9,4	97,4	2,6
9,6	98,5	1,5

Tampon veronal sodic-acetat

(după M i c h a e l i s)

pH: 2,6 — 9,4

Soluţie A: acetat de sodiu în 1/7 barbital sodic (19,43 g $C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$ + 29,43 g $C_8H_{11}N_2NaO_3$/ 1 H_2O)

Soluţie B: 0,1 N HCl

pH	Soluţie A ml	Soluţie B ml	+ 8,5% — NaCl-Soluţie ml
2,6	50	160,5	20
2,8	50	157,5	20
3,0	50	154,5	20
3,2	50	150,0	20
3,4	50	146,0	20
3,6	50	140,0	20
3,8	50	133,5	20
4,0	50	125,5	20
4,2	50	117,5	20
4,4	50	109,5	20

Scanned with OKEN Scanner

(continuare)

pH	Soluţie A ml	Soluţie B ml	+ 8,5% — NaCl-Soluţie ml
4,6	50	101,5	20
4,8	50	94,5	20
5,0	50	88,0	20
5,2	50	82,5	20
5,4	50	78,0	20
5,6	50	75,0	20
5,8	50	72,5	20
6,0	50	71,0	20
6,2	50	69,5	20
6,4	50	68,5	20
6,6	50	66,5	20
6,8	50	64,0	20
7,0	50	60,5	20
7,2	50	56,5	20
7,4	50	50,5	20
7,6	50	43,0	20
7,8	50	34,5	20
8,0	50	26,0	20
8,2	50	18,5	20
8,4	50	13,0	20
8,6	50	9,0	20
8,8	50	6,0	20
9,0	50	4,0	20
9,2	50	2,0	20
9,4	50	1,0	20

Se completează cu apă distilată pînă la 250 ml.

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

1. Arnold, M., 1968: Histochemie, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York
2. Arvy, L. 1957—58: Les techniques actuelle d'Histo-enzymologie, Biologie Médicale
3. Arvy, L., 1963: Histo-enzymologie des glandes endocrines, Ed. Gauthier—Villars, Paris
4. Baker, J. R., 1958: Principles of biological microtechnique, Ed. Methuen, London
5. Burck, H. C., 1969: Histologische Technik, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
6. Barka, T., P. S. Anderson, 1965: Histochemistry, Ed. Hoeber, New York
7. Burstone M. S., 1962: Enzyme histochemistry and its application in the study of neoplasms, Ed. Academic Press, New York
8. Cajal, N., I. Cojocaru, S. Comorosan, P. Dăncescu, T. Ieremia, V. Kondi, N. Mitrica, 1964: Metodele laboratorului clinic, Ed. medicală, București
9. Cajal, N., 1962: Manual de laborator clinic, Ed. medicală, București
10. Cowdry, E. V., 1948: Microscopic technique in Biology and Medicine, Ed. Williams—Wilkins, Baltimore
11. Csillik, B., 1967: Functional structure of the post-synaptic membrane in the myoneural junction, Akadémiai Kiado Budapest
12. Culling, C. F. A., 1963: Handbook of Histopathological Techniques, Butterwotlid, London
13. Danielli, J.F., 1961: General cytochemical methods, Ed. Academic Press, New York

Scanned with OKEN Scanner

33. Policard, A., M. Bessis, M. Locquin, 1957: Traité de Microscopie, Paris
34. Raicu, P., Nachtigal, 1969: Citogenetica, Ed. Acad. R.S.R. Bucureşti
35. Romeis, B., 1948: Mikroskopische Technik, Oldenbourg, München
36. Rommel, W., 1966: Zuchthygienisches Laboratorium, Ed. S. Hirzel, Leipzig
37. Spannhof, L., 1967: Einführung in die Praxis der Histochemie, VEB Gustav Fischer, Verlag Jena
38. Tănăsescu, Gh., G. Ivanovici, 1968: Ghid de tehnici curente în laboratorul clinic, Ed. medicală, Bucureşti
39. Thompson, S. W., 1966: Selectid Histochemical and Histopatological Methods, Charles C, Thomas, Publischer Springfield Illinois
40. Tudoran, Gh., Aurelia Bratianu, Maria Nicu-lescu, 1959: Metode de explorare de laborator în bolile sistemului hematopoietic şi ale sîngelui, Ed. medicală, Bucureşti
41. Zemjinis, R., 1962: Diagnostic and Therapeutic Techniques in Animal Reproduction, Ed. Williams—Wilkins, Baltimore
42. Zimmermann, H., 1971: Histochemie-der Ultrastruktur, Acta Histochemica- Suppl. band X, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena

Scanned with OKEN Scanner

CUPRINS

Capitolul I. *Principiile generale ale tehnicii histochimice* 3
A. Definiţie. Domenii de aplicare 3
B. Condiţiile exactităţii metodelor histochimice 5
1. Fixarea histochimică (5); 2. Reacţiile pentru vizualizarea reacţiilor cercetate (10) . . . . . .
C. Specificitatea şi sensibilitatea reacţiilor histochimice . 13

Capitolul II. *Pretratamentul probelor pentru reacţii histochimice* 20
A. Recoltarea 20
B. Fixarea cu agenţi chimici 21
1. Practica fixării (28) 2. Fixarea cu vapori 30
C. Metode speciale pentru pretratamentul probelor . . 31
1. Secţionarea la microtomul cu congelare (32); . . .
2. Secţionarea la criotom (criostat) (35); 3. Metoda de congelare-deshidratare (Crio-desicare) (43); 4. Metoda de congelare-substituţie (crio-substituţie) (53)
D. Decalcificarea în scopuri histochimice 61
E. Includerea 67
F. Secţionarea, etalarea şi montarea 70

Capitolul III. *Evidenţierea histochimică a substanţelor minerale* 75
Aluminiu (75), Argint (76), Arsenic (78), Aur (78), Bariu şi Stronţiu (79), Beriliu (79), Bismut (81), Calciu (82), Cloruri (86), Cobalt (86), Cupru (87), Fier (88), Fosfor (92), Iod (93), Magneziu (93), Mangan (94), Nichel (95), Plumb (96), Potasiu (97), Sodiu (99), Stronţiu (100), Zinc (100),

Capitolul IV. *Evidenţierea histochimică a unor proprietăţi comune legate de anumiţi radicali şi funcţii* . . 102

Scanned with OKEN Scanner

A. Evidențierea histochimică a compușilor reductori . . 102
B. Studiul histochimic al acidofiliei 106
C. Studiul histochimic al bazofiliei 107
D. Determinarea zonei punctului izoelectric al proteinelor tisulare 108
E. Studiul metacromaziei 111
F. Alte colorații pentru radicalii anionici 116
G. Reacții pentru aldehide și cetone 118
1. Reactivul Schiff (119); 2. Complexe alcaline de argint (122); 3. Parafenilendiamina (122); 4. Fenilhidrazinele (123); 5. Hidrazida acidului 2-hidroxi-3-naftoic (124); 6. Reacții de blocaj pentru aldehide (124)
H. Reacții pentru fenoli și naftoli 126
1. Azoreacția (126); 2. Reacția argentafină (133); 3. Reacția cromafină (feocromă) (133).

Capitolul V. *Evidențierea histochimică a aminoacizilor și protidelor* 135
A. Reacții generale pentru evidențierea proteinelor ca atare 137
B. Reacții pentru grupări aminate libere 139
C. Reacții pentru evidențierea unor aminoacizi 143
1. Evidențierea radicalului guanidil și argininei (143); 2. Evidențierea tirozinei (144); 3. Reacții pentru evidențierea triploforului (147) 4. Reacții pentru evidențierea cisteinei și cistinei (grupările —SH și —S— —S— (150).
D. Alte metode pentru studiul histochimic al proteinelor 157
1. Evidențierea caracteristicilor electropolare (157);
2. Aprecierea zonei punctului izoelectric (158);
3. Utilizarea enzimelor în histochimia proteinelor (158)

Capitolul VI. *Acizii nucleici și nucleoproteinele* . . . 162
A. Metode pentru histone și baze pirimidinice 164
B. Metode bazate pe evidențierea bazofiliei acizilor nucleici 167
C. Reacții nucleale 174
D. Metode de control prin extracția acizilor nucleici . . 182
1. Extracția enzimatică. (182). Extracția cu ribonuclează (182); 2. Procedee de extracție chimică (184)

Capitolul VII. *Enzimele* 185
A. Importanța și rolul reacțiilor histoenzimatice . . . 185
B. Principiile evidențierii histotopochimice a activității enzimelor 186

Scanned with OKEN Scanner

C. Etapele efectuării preparatului histoenzimatic 189
D. Specificul interpretării reacţiilor histoenzimatice . . 198
E. Metode pentru clasa Oxidoreductaze 203
1. Dehidrogenaze NAD şi NADP dependente (203); 2. Glucozo-6-fosfat-dehidrogenaza (205); 3. Steroid-3-betadehidrogenaza (206); 4. Succindehidrogenaza (207); 5. Monoaminooxidaza (209); 6. Citocromoxidaza (211); 7. Tirozinaza (214); 8. Peroxidaza (216); 9. Diaforaza NAD şi Diaforaza NADP (221)
F. Metode pentru clasa Hidrolaze 224
1. Esteraza nespecifică (224); 2. Lipaza (228); 3. Colinesteraza (230); 4. Fosfataza alcalină nespecifică (235); 5. Fosfataza acidă nespecifică (239); 6. 5-Nucleotidaza (243); 7. Glucozo-6-fosfataza (244); 8. Dezoxiribonucleaza (245); 9. Sulfataza (247); 10. Beta-glucuronidaza (248); 11. Alfa-glucoronidaza (251) 12. Beta Glucozidaza (252); 13. Beta-galactozidaza (253); 14. Leucin-aminopeptidaza (253); 15. Adenozintrifosfataza sau ATP-aza (256); 16. Ribonucleaza (258); 17. Fosfoamidaza (260)
G. Metode pentru clasa Transferaze 261
1. Fosforilaza (261).
H. Metode pentru clasa Liaze 263
1. Anhidraza carbonică (263)
Capitolul VIII. *Glucidele* 265
A. Fixarea 266
B. Reacţii pentru grupări glicol 269
1. Reacţia PAS şi reacţii echivalente (269); Variante ale reacţiei PAS (273); 2. Procedee de control şi variante ale reacţiei PAS (278); Controlul reacţiei PAS prin blocajul aldehidelor (284).
C. Reacţii pentru grupele acide 284
1. Metode bazate pe utilizarea coloranţilor bazici (284);
2. Metode bazate pe fixarea ionilor metalici (287);
3. Colorarea cu paraldehidă-fucsină (290);
4. Reacţia metacromatică în studiul glucidelor (292);
5. Metode de fluorescenţă (307).
D. Metode de colorare combinate 308
E. Evidenţierea diferitelor varietăţi de glucide 314
Capitolul IX. *Lipidele* 317
A. Coloraţii generale pentru lipide 320
B. Tehnici de extragere a lipidelor 421

C. Metode de identificare histochimică a anumitor lipide 321
1. Anizotropia optică (322); 2. Evidențierea caracterului acid (323); 3. Evidențierea fosfolipidelor (326); 4. Evidențierea grupării carbonil a lipidelor (333); 5. Evidențierea caracterului nesaturat al lipidelor (334); 6. Evidențierea componenților glucidici ai lipidelor (341); 7. Evidențierea altor tipuri de lipide (341); 8. Reacții pentru steroli și steroizi (344); 9. Evidențierea grupelor carbonil ale cetosteroizilor (348).

Capitolul X. *Pigmenții* 351
A. Clasificare și scurtă caracterizare a pigmenților . . 351
B. Identificarea histochimică a pigmenților 353
1. Decolorarea pigmenților (354); 2. Reacții histochimice pentru pigmenți (360);

Capitolul XI. *Vitamine și amine biogene* 372
A. Vitamine 372
1. Vitamina A (372); 2. Grupul vitaminelor B (373); 3. Vitamina C (374); 4. Vitamina D (377)
B. Amine biogene 377

Capitolul XII. *Aplicarea reacțiilor histochimice la studiul unor produse patologice* 388
A. Substanța amiloidă 388
B. Fibrinoidul și fibrina 391
C. Patologia metabolismului lipidic; degenerescența mielinică, dislipidoze 394
Degenerescența mielinică (394); Dislipidoze (396)
D. Patologia metabolismului mucopolizaharidelor . . . 396
E. Studiul histochimic al produșilor de catabolism . . . 397
Reacții pentru purine 397
Apendix 402
Bibliografie 415

Scanned with OKEN Scanner

Redactor: ing. MAGDALENA DUMITRIU
Tehnoredactor: DUMITRU MAZILU

Bun de tipar: 12.05.1976. Apărut: 1976. Tiraj: 1400 ex. Coli editoriale: 18,10. Coli de tipar: 13,25. C.Z. pentru bibliotecile mari: 636.089. C.Z. pentru bibliotecile mici: 636.

Întreprinderea Poligrafică Cluj.
Municipiul Cluj-Napoca, str. Brassai nr. 5—7.
Republica Socialistă România
Comanda nr. 95/1976

Scanned with OKEN Scanner